

**HETEROZYGOTEN-SUCHTEST
BEI WISKOTT-ALDRICH-SYNDROM**

Wolfgang Prändl



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0100

Aus der Kinderklinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

HETEROZYGOTEN-SUCHTEST

BEI WISKOTT-ALDRICH-SYNDROM

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Wolfgang Prändl

aus

Neuburg/Donau

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. H.J. Klose

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H.-B. Hadorn

Prof. Dr. J. Murken

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 11. 1986

MEINER EHEFRAU INGEBORG
UND MEINEM SOHN FLORIAN

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
1. Beschreibung des WISKOTT-ALDRICH-Syndroms (WAS) unter Berücksichtigung der Heterozygoten und des Heterozygotentests von SHAPIRO et al. (59)	1
2. Ein weiterer Heterozygotennachweis durch Isoenzymbestimmung (23)	9
II. Physiologische und biochemische Grundlagen der Thrombozyten-Aggregation	11
III. Theoretische Grundlagen des Heterozygotentests nach SHAPIRO et al. (59)	15
1. Plättchen-Energiemetabolismus bei WAS und WAS-Heterozygoten	15
2. Stoffwechselblocker: 2-Deoxy-D-Glukose (DDG) und Antimycin A (Ant A)	16
3. SHAPIROs et al. Ergebnisse und Diskussion	18
IV. Beschreibung der eigenen Methode	20
1. Material und Reagentien	20
2. Reinigung	21
3. Herstellung der gebrauchsfertigen Lösungen	21
4. Blutentnahme	22
5. Zentrifugation und Thrombozytenzählung	22
6. Beschreibung des Aggregationsmeßplatzes	23
7. Eichung des Photometers und des Kompensations-schreibers	25
8. Versuchsplan	25
9. Vorbereitung der Aggregationsröhrchen	27
10. Inkubation des plättchenreichen Plasma (PRP) mit oder ohne Stoffwechselblocker vor der Aggregation	27
11. Aggregation des PRP durch Adrenalin	27
12. Auswertung der Aggregationskurven	28

	Seite
V. Eigene Voruntersuchungen zur Verbesserung der Aggregabilität durch Adrenalin	30
1. Literaturübersicht	30
2. Reduzierung der Unzuverlässigkeit der Adrenalin-induzierten Plättchenaggregation	32
3. Diskussion der Ergebnisse zur Adrenalin-induzierten Plättchenaggregation	35
4. Störfaktoren der Aggregation	37
5. Gewinnung des plättchenreichen Plasma	39
6. Lagerung des plättchenreichen Plasma	40
VI. Thrombozyten-Volumen-Verteilung (TVV)	41
VII. Ergebnisse und Diskussion der Heterozygoten-testung	43
1. Patientengruppe	43
2. Kontrollgruppe	43
3. Ergebnisse des Heterozygotentests	44
4. Ergebnisse der Thrombozyten-Volumen-Ver- teilung	47
5. Vergleich: Heterozygotentest - TVV	49
6. Diskussion	50
VIII. Zusammenfassung	54
IX. Literaturverzeichnis	56

I. Einleitung

1. Beschreibung des WISKOTT-ALDRICH-Syndroms (WAS) unter Berücksichtigung der Heterozygoten und des Heterozygotentests von SHAPIRO et al. (59)
-

Die Erstbeschreibung des WISKOTT-ALDRICH-Syndroms geht auf WISKOTT (72) im Jahre 1937 zurück. In dieser Veröffentlichung berichtete WISKOTT von einer Erkrankung dreier Brüder, welche besonders durch Darmblutungen, Anergie gegenüber Infekten und Ekzemkonstitution charakterisiert ist. Alle drei Buben starben vor Vollendung des zweiten Lebensjahres. WISKOTT vermutete bereits eine Erbllichkeit der Erkrankung.

Unabhängig von WISKOTT berichteten ALDRICH et al. (1) 17 Jahre später von der Krankengeschichte eines Buben, der als einer von zehn Buben in der Verwandtschaft an Ohrenentzündung, Ekzem und blutigen Durchfällen litt. ALDRICH et al. zeigten am Stammbaum dieser Familie über sechs Generationen, daß von 40 männlichen Nachkommen 16 im frühen Kindesalter verstorben waren. Keiner der weiblichen Nachkommen hatte Zeichen dieser Erkrankung. Mittels einer genetischen Analyse fanden ALDRICH et al., daß diese Erkrankung offensichtlich nach einem x-rezessiven Muster vererbt wird.

KRIVIT u. GOOD (34) bestätigten 1959 den x-rezessiven Erbmodus des "ALDRICH-Syndroms" und stellten die ersten umfangreicheren immunologischen Untersuchungen an. Besonders auffallend war ein Mangel, teilweise sogar ein Fehlen von natürlichen Isoagglutininen. Auch alle Patienten von KRIVIT u. GOOD verstarben sehr jung, noch vor Erreichen des vierten Lebensjahres.

Zur besseren Übersicht seien nun im Folgenden die Merkmale und die Therapie des WISKOTT-ALDRICH-Syndroms (in nicht mehr historischer Reihenfolge) beschrieben.

- Blutungsprobleme bei WAS:

In einer groß angelegten retrospektiven WAS-Studie fanden PERRY et al. (51) bei 27 % der WAS-Patienten als Todesursache Blutungen, in der Hauptsache im Zentralnervensystem, zum Teil auch generalisiert. KRIVIT u. GOOD (34) untersuchten die Thrombozytopoese und stellten normale Megakaryozyten bei einer offensichtlich normalen Thrombozytopoese - bei jedoch peripherer Thrombozytopenie - fest. Auf der Suche nach der Ursache dieser Konstellation transfundierten KRIVIT et al. (35) Thrombozyten gesunder Spender und fanden eine normale Überlebenszeit dieser Thrombozyten. BALDINI (5) konnte diese Ergebnisse bestätigen. Nach Transfusion von WAS-Plättchen in gesunde Probanden demonstrierte er eine stark reduzierte Überlebenszeit der transfundierten Thrombozyten. In Übereinstimmung mit GRÖTTUM et al. (26) bezog auch BALDINI diese Ergebnisse auf einen qualitativen Thrombozytendefekt mit einer gesteigerten peripheren Zerstörung. Nach CORASH et al. (19), NATHAN (44) und anderen Autoren (3, 43) scheint der Ort des verstärkten Thrombozytenabbaus in der Milz zu liegen. Sowohl CORASH et al. als auch NATHAN stellten nach Splenektomie eine Vergrößerung der sonst bei WAS mikrozytären Thrombozyten bis zum Normalbereich sowie einen deutlichen Anstieg der Thrombozytenzahl im peripheren Blutbild fest.

GRÖTTUM et al. (26) entdeckten neben den oben beschriebenen Auffälligkeiten auch eine Thrombozytopathie, meßbar z.B. an einer veränderten ADP- und Collagen-Aggregation. Biochemische Untersuchungen zeigten einen stark reduzierten Plättchenenergiespeicher. Einen Defekt in der Regulation des Zitronensäurezyklus vermuteten KURAMOTO et al. (36) aufgrund indirekter Messungen des Energiestoffwechsels der Blutplättchen mit radioaktiven Metaboliten. Sie fanden

denselben Defekt auch bei einer klinisch gesunden Heterozygoten. Biochemische Studien von BALDINI (5) unterstützten diesen Befund. BALDINI vermutete das Fehlen eines physiologischen Aktivators des KREBS-Zyklus, welcher in den alpha-Granula der Thrombozyten gespeichert zu sein schien. Funktionell ist diese Substanz möglicherweise ein proteolytisches Enzym, da die Plättchen mit Thrombin, einer Protease, regelrecht aggregiert werden konnten. Auch BALDINI fand u.a. mittels Adrenalin-induzierter Thrombozytenaggregation einen Plättchendefekt bei einer sicheren und einer möglicherweise heterozygoten Mutter. Dieses Phänomen versuchten SHAPIRO et al. (59) und GERRARD et al. (25) für einen - in Kapitel III beschriebenen - Heterozygotentest zu nutzen.

Das von GRÖTTUM et al. (26) und KURAMOTO et al. (36) gefundene Aggregationsdefizit bei WAS-Plättchen konnten OCHS et al. (48) nicht bestätigen. Sie führten die Ergebnisse GRÖTTUMs et al. und KURAMOTOs et al. auf fehlerhafte Aggregationsmessungen mit zu geringer Thrombozytenzahl zurück. Auch lehnten sie BALDINIs Theorie eines thrombozytären Stoffwechseldefekts ab und machten einen extrathrombozytären Faktor für die verkürzte Plättchenüberlebenszeit verantwortlich.

- Thrombozytenmorphologie bei WAS

Die Plättchengrößenverteilung bei WAS zeigte nach MURPHY et al. (43) eine deutliche Verminderung der Durchschnittsgröße auf fast die Hälfte der Norm. Splenektomierte WAS-Patienten wiesen etwas größere, aber noch subnormal große Thrombozyten auf; Heterozygote waren normozytär. Im Gegensatz zu GRÖTTUM et al. (26) fanden MURPHY et al. (43) bei den WAS-Plättchen eine normale elektronenoptische Ultrastruktur.

Die Thrombozytenorganellen wie alpha-Granula, Mitochondrien

und Glykogengranula waren nach GRÖTTUM et al. (26) deutlich an Zahl reduziert. Das Plättchenvolumen war im Durchschnitt um den Faktor 3 kleiner als bei den gesunden Probanden. BALDINI (5) fand ebenfalls strukturelle Abweichungen wie GRÖTTUM et al. (26). Außerdem untersuchte er noch die Thrombozyten bei einer WAS-Heterozygoten und stellte keine morphologischen Unterschiede der thrombozytären Organellen im Vergleich zur Norm fest. Im Gegensatz zu den bisher genannten Autoren halten OCHS et al. (48) die oben erwähnten strukturellen Defekte der WAS-Thrombozyten für Präparationsartefakte. Bei ihren Untersuchungen lag die Thrombozytenvolumenverteilung der Heterozygotenplättchen wie auch die der WAS-Plättchen innerhalb des Normbereichs. Wie MURPHY et al. und OCHS et al. fanden auch PRCHAL et al. (52) keine mikrothrombozytäre Subpopulation bei Heterozygoten.

- Therapie der hämorrhagischen Diathese bei WAS

Neben der Substitutionstherapie mit Thrombozytenkonzentrat, Frischblut oder der Pharmakotherapie mit hochdosierten Corticosteroiden (BELOHRADSKY (7)) wurde versucht, durch Splenektomie die Blutungsneigung bei WAS auf Dauer zu reduzieren (19, 34, 38, 44, 50, 68). Häufig erhöhte sich durch diese Maßnahme die Anzahl der Thrombozyten, gelegentlich sogar bis zu Normalwerten. Auch die Thrombozytenfunktion normalisierte sich (CORASH et al. (19)). Problematisch war jedoch bei dieser Therapieform, daß die Patienten noch häufiger und schwerer an Infektionen erkrankten und daß v.a. die ganz jungen Patienten häufiger an Infektionen und Sepsis verstarben (BELOHRADSKY et al. (7)). Niedrig dosierte Corticosteroid-Dauertherapie wurde wegen der vielfältigen Nebenwirkungen und wegen der nicht sicheren Hauptwirkung - der Blutungsprophylaxe - wieder aufgegeben (BELOHRADSKY et al. (7)).

- Immunologische Probleme bei WAS

PERRY et al. (51) nennen Infektionen bei WAS (57 %) als Haupttodesursache. In der Tat scheint bei WAS ein schwerer Defekt sowohl der B-Zell-Immunität als auch der T-Zell-Immunität vorzuliegen (7). Beispielsweise hatten WAS-Patienten konstant erniedrigte Isoagglutinin-Titer (15,18, 26,34,73). Auch fand man pathologische Immunglobulinmuster; so waren häufig IgM erniedrigt, IgE und IgA erhöht, IgG und IgD normal (7,9,14,18,73). Die defekte T-Zell-Immunität wurde nachgewiesen durch fehlende Hautsensibilisierung mit 2,4-Dinitrofluorobenzol oder z.B. auch durch verzögerte Abstoßung homologer Hauttransplantate. Auch blieben WAS-Patienten nach BCG-Impfung tuberkulinnegativ (7,9,18, 73).

Diese Immunschwäche scheint der Grund für viele bei WAS überdurchschnittlich häufig vorkommende infektiöse Erkrankungen und Komplikationen zu sein. Besonders gehäuft treten auf bakterielle Otitiden, Pneumonien und Meningitiden mit zum Teil schlechter Prognose. Häufig erkranken die Patienten auch an Virusinfektionen wie Herpes oder Zytomegalie, die zum Teil generalisieren mit - quoad vitam - ebenfalls sehr schlechter Prognose. Virusbedingte Kinderkrankheiten verlaufen in der Regel relativ ernst (7).

Auch bei Kindern sehr seltene Erkrankungen wie z.B. die monoklonale Gammopathie (14) oder Arteriitis mit Koronarthrombosen (22) werden als Komplikation oder Folge der Immunschwäche aufgefaßt.

BELOHRADSKY et al. (7) veranschlagen die Inzidenzrate für maligne Tumoren bei WAS mit ca. 15 %. In der Hauptsache wird das lymphoretikuläre System befallen (7,18,24). Als Hauptursache für die extreme Gefährdung durch Malignome wird allgemein der chronische Reiz des insuffizienten Immunsystems angenommen (7,8,51).

~ Aktueller Stand der Therapie bei WAS

Die Splenektomie als Therapieform bei WAS wurde bereits im Abschnitt "Therapie der hämorrhagischen Diathese" (siehe S. 4) erwähnt. Neben symptomatischer Therapie zur Beherrschung von Akutproblemen wurden als bislang erfolgversprechendste Behandlung bei geeigneten Patienten Knochenmark-Transplantationen durchgeführt. So berichten manche Autoren von einer deutlichen Verbesserung sowohl der klinischen Symptome als auch verschiedener Laborparameter; manche Autoren sprechen von einer vollständigen Korrektur des WAS (3,4,32,37,49).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz ist die Transfer-Faktor-Therapie. Der Transfer-Faktor, ein biochemisch bisher nicht hinreichend bestimmbares Dialysat aus antigenstimulierten Leukozyten, wurde zur Verbesserung der T-Zell-Immunität eingesetzt. Durch die Therapie mit Transfer-Faktor stellte SPITLER (61) bei mehr als der Hälfte der Patienten eine klinische Besserung fest, u.a. Besserung des Ekzems, Verminderung der Infektionsraten und geringere Blutungsneigung. Mögliche Nebenwirkungen dieser Therapie waren u.a. hämolytische Anämie, Nierenerkrankungen und Enteropathien mit Proteinverlust (6,61).

Immunglobulin-Dauerapplikation und Frischplasma-Infusionen sollen zu einer geringen klinischen Besserung führen, sind aber in ihrem Wert umstritten (7).

Abgesehen von einer symptomatischen Ekzemtherapie mit fraglichem Erfolg führte nach bisherigen Erfahrungen die Therapie der Immundefizienz auch zur Besserung der ekzematösen Effloreszenzen.

- Prognose des WAS

BELOHRADSKY et al. (7) stellten in einer umfangreichen Studie eine leicht positive Tendenz zu etwas erhöhter Lebenserwartung fest. Insgesamt beurteilen sie die Prognose als infaust (durchschnittliche Lebenserwartung von 3,29 Jahren (n=101)). Einzelfälle, die das geschlechtsreife Alter erreichten, sind möglicherweise nicht dem klassischen WAS zuzuordnen.

PERRY et al. (51) fanden einen signifikanten Unterschied in der Lebenserwartung der Patienten, die vor 1954, und der Patienten, die nach 1954 geboren worden waren. So verdoppelte sich die Lebenserwartung der nach 1954 geborenen WAS-Patienten auf durchschnittlich 5,7 Jahre. Das Durchschnittsalter der heute noch lebenden WAS-Patienten in den USA beträgt 10 Jahre; der älteste ist nach PERRYs et al. Angaben 36 Jahre alt. Ob dies an einer verbesserten Therapie oder an einer heute exakteren diagnostischen Klassifizierung oder auch an beidem liegt, ist nach PERRY et al. nicht zu entscheiden.

- Vererbungsmodus des WAS

Wie anfangs schon erwähnt, hielt bereits der Erstbeschreiber WISKOTT (72) das "WAS" für eine Erberkrankung. Diese Vermutung wurde von ALDRICH et al. (1) genauer untersucht und bestätigt. Sie kamen zu dem Schluß, daß das WAS x-chromosomal rezessiv vererbt sein muß.

Der x-rezessive Erbgang (unter besonderer Berücksichtigung des WAS) kann wie folgt charakterisiert werden:

1. Ein Gen verhält sich rezessiv gegenüber seinem Allel, wenn seine Wirkung im heterozygoten Zustand nicht phänotypisch erkennbar ist. Das heißt auf das WAS bezogen, daß Überträgerinnen des WAS klinisch gesund erscheinen. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, daß nicht

eine zufällige x-Inaktivierung (Lyon-Hypothese*) während der Embryogenese stattfindet, sondern daß in der Hauptsache das defekte x-Chromosom inaktiviert wird. Einen Hinweis darauf fanden GEALY et al. (23) bei einer WAS-Heterozygoten.

2. Da männliche Nachkommen immer das x-Chromosom von der Mutter bekommen, besteht im Fall einer Heterozygotie der Mutter eine 50 %ige Wahrscheinlichkeit für die Übertragung des defekten x-Chromosoms auf den männlichen Nachkommen. Die weiblichen Nachkommen haben ebenfalls ein Risiko von 50 %, heterozygot zu sein. Klinisch ist der chromosomale Defekt bei Heterozygoten jedoch nicht zu erkennen.

3. Weibliche Homozygote gibt es bei WAS praktisch nicht, da die betroffenen männlichen Familienmitglieder die Geschlechtsreife in aller Regel nicht erleben.

Zur Spontanmutationsrate bei WAS gibt es vermutlich wegen der extremen Seltenheit der Erkrankung keine verbindlichen Aussagen. BELOHRADSKY et al. (7) fanden zu je gleichen Teilen Familienfälle, Geschwisterfälle und sporadische Fälle, wobei letztere entweder auf Spontanmutation oder rein zufälliges Weitervererben auf nur einen Sohn zurückgeführt werden konnten. Nach MURKEN (42) wäre - wie auch bei anderen x-chromosomal vererbten Krankheiten - bei WAS eine Spontanmutationsrate von ca. 30 % zu erwarten. SHAPIRO et al. (59) hielten Heterozygotie der Mutter für erwiesen, wenn Familien- oder Geschwisterfälle nachzuweisen waren.

* Die Postulate der Lyon-Hypothese lauten:

1. In Zellen normaler weiblicher Säugerorganismen ist eines der beiden X-Chromosomen genetisch inaktiviert.
2. Das inaktivierte X-Chromosom kann in verschiedenen Zellen des gleichen Organismus väterlicher oder mütterlicher Herkunft sein.
3. Die Inaktivität tritt früh in der Embryonalentwicklung auf und bleibt während der ganzen weiteren Entwicklung jeder Zelllinie bestehen.

(LYON, M.F.: Sex chromatin and gene action in the mammalian X-chromosome. Amer. J. hum. Genet. 14, 135 (1962))

2. Ein weiterer Heterozygotennachweis durch Isoenzym-
bestimmung (23)

Neben dem bereits kurz erwähnten Versuch von SHAPIRO et al. (59), latente, klinisch jedoch kompensierte Stoffwechseldefekte heterozygoter Thrombozyten in einem Thrombozytenfunktionstest nachzuweisen (siehe S. 3), gibt es zum Heterozygotennachweis im wesentlichen noch einen weiteren Ansatz, nämlich die Bestimmung der Isoenzyme A und B der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) in verschiedenen korpuskulären Blutbestandteilen wie Thrombozyten, T-Lymphozyten, Erythrozyten, Granulozyten usw. (GEALY et al. (23)). GEALY et al. gingen davon aus, daß WAS-Heterozygote eine klinisch normale Thrombozyten- und T-Lymphozytenfunktion zeigen, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß in früher Embryonalzeit Zelllinien, bei denen sich der WAS-Defekt ausgewirkt hätte (Thrombozyten und T-Lymphozyten) nicht - wie physiologischerweise - zufällig, sondern gezielt inaktiviert wurden (siehe S. 8). Die G-6-PD ist auf dem x-Chromosom kodiert und kommt bei manchen Rassen häufig als Isoenzym A und B vor. Die oben beschriebene Voraussetzung der nicht-zufälligen Inaktivierung eines x-Chromosoms bei WAS-Heterozygoten würde dazu führen, daß WAS-Überträgerinnen in Thrombozyten und T-Lymphozyten nur ein Isoenzym, in den anderen Zellgruppen des Blutes jedoch beide Isoenzyme aufweisen. Diese Hypothese konnten GEALY et al.(23) bei zwei sicheren Heterozygoten und drei Kontrollprobanden bestätigen.

PRCHAL et al. (52) konnten die Ergebnisse GEALYs et al. durch die Isoenzymuntersuchung der G-6-PD bei einer anderen WAS-Familie weitgehend bestätigen. Für die Isoenzymuntersuchung waren jedoch nur Probandinnen geeignet, die heterozygot sowohl für das Isoenzym A als auch für das Isoenzym B der G-6-PD waren.

CARROLL et al. (16) bezweifeln die theoretische Erklärung GEALys et al. und halten sie beim derzeitigen Stand der Forschung für unberechtigt.

Träfe die Theorie GEALys et al. zu, dann wäre SHAPIROs et al. (59) Test seiner theoretischen Grundlage beraubt. Würde nämlich bei WAS-Heterozygoten das für den Thrombozyten-Stoffwechseldefekt verantwortliche x-Chromosom inaktiviert, so könnte ein Thrombozyten-Stress-Test zur Demaskierung der Heterozygoten (siehe Kap. III) nicht eingesetzt werden.

II. Physiologische und biochemische Grundlagen der Thrombozyten-Aggregation

- Energieversorgung und Energiebedarf der Thrombozyten

Zur Aufrechterhaltung des Ruhestoffwechsels der Blutplättchen und zur Ausführung ihrer spezifischen Leistungen wie Adhäsion und Aggregation ist Energie in Form von energiereichen Nukleotiden notwendig. Der gesamte Vorrat an Adenin-Nukleotiden muß vollständig von den Megakaryozyten mitgegeben worden sein, da die Plättchen in vitro unfähig sind, Adenin-Nukleotide aus Glycin aufzubauen und Adenin oder Adenosin normalerweise im Plasma nicht vorkommen. Allerdings ist im zirkulierenden Plättchen der Aufbau von Adenosin-Monophosphat (AMP), Adenosin-Diphosphat (ADP) und Adenosin-Triphosphat (ATP) aus Adenin oder Adenosin möglich. ATP kann hierbei sowohl über die Glykolyse als auch über den KREBS-Zyklus gewonnen werden. Beide Prozesse sind unter in vitro-Bedingungen zu jeweils ca. 50 % an der ATP-Produktion beteiligt.

Jeder Schritt der Aggregation - Formänderung der Plättchen, primäre Aggregation und Freisetzungsreaktion - benötigt einen Minimal-Spiegel an metabolisch verfügbarem ATP im Blutplättchen, um den phasengerechten Aggregationsablauf zu gewährleisten (29,69).

- Metabolische Reaktion bei Plättchenstimulation

Thrombozyten reagieren auf eine Stimulation mit einem Aggregationsauslöser mit einer Steigerung der Glykolyse, der Glykogenolyse und der Aktivierung des KREBS-Zyklus, um die sich leerenden ATP-Speicher wieder zu füllen. Die Aktivität der Schlüsselenzyme der Glykolyse und der oxidativen Phosphorylierung soll durch die Gesamtenergieladung des Thrombozyten an energiereichen Adenin-Nukleotiden

geregelt sein (69). Diese metabolische Reaktion der ATP- und ADP-Gewinnung ist nur für die primäre Aggregation und für die Freisetzungsreaktion notwendig. Sie wird in der Literatur dem sog. "metabolic pool" zugeordnet (70). Für die reversible bzw. irreversible Aggregation ist der sog. "storage pool" verantwortlich, d.h. während der 3. und 4. Stufe der Aggregation findet man keinen Aktivitätsanstieg des KREBS-Zyklus oder der Glykolyse, da nur bereits gespeichertes ADP und ATP aufgebraucht wird ((62), siehe auch Abb.1).

- Biochemie und Physiologie der Plättchen-Aggregation

Thrombozyten können in vitro durch verschiedene Substanzen wie ADP, Thrombin, 5-Hydroxytryptamin (5-HT), Adrenalin, Fettsäuren, Immunkomplexe, destilliertes Wasser, Collagen, Basalmembranen etc. zu einer im wesentlichen gleichartigen 4-stufigen Reaktion veranlaßt werden. Abb.1 zeigt schematisch die Morphologie der Thrombozyten bei Aggregation.

Fügt man einen der oben angeführten Aggregationsauslöser (mit Ausnahme von Adrenalin) in ausreichender Menge plättchenreichem Plasma (PRP) zu, so verändern sich die Thrombozyten sehr schnell von einer scheibenartigen in eine kugelige Form mit pseudopodienartigen Ausstülpungen. Sodann ballen sich benachbarte Thrombozyten zu größeren Aggregaten zusammen. Dieser Vorgang wird Plättchen zu Plättchen - Adhäsion, primäre Aggregation oder erste Phase der Aggregation genannt.

Eine Ausnahme bildet Adrenalin als Aggregationsauslöser: Dieses führt über Stimulation von alpha-Rezeptoren an der Plättchenmembran direkt ohne Formänderung zur Aneinanderlagerung von benachbarten Plättchen. Für die weiteren Aggregationsstufen ist die Reaktion auf Adrenalin und die anderen Aggregationsauslöser wieder gleich.

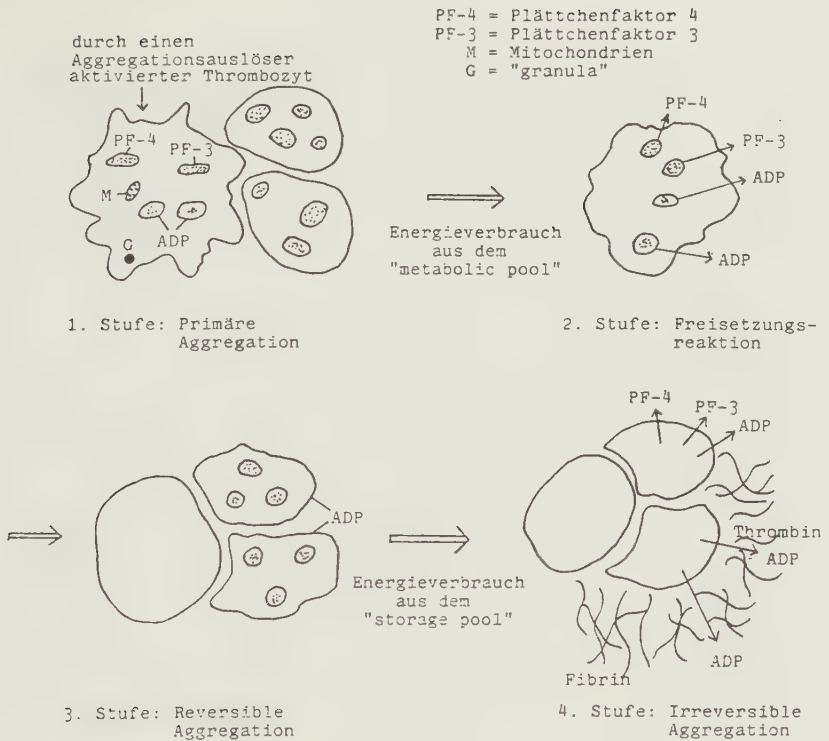


Abb.1:

Morphologie der Thrombozyten bei Aggregation
(modifiziert nach STORMORKEN (62))

Diesem ersten Schritt der Aggregation folgt bei ausreichender Konzentration des Aggregationsauslösers als 2. Stufe die Freisetzungsreaktion oder "release reaction". Vermutlich durch den Stimulus der primären Aggregation wird die Freisetzungsreaktion initiiert, d.h. der Thrombozyt wird veranlaßt, bestimmte Substanzen, welche in den Zellorganellen (Granula) gespeichert sind, aus der Zelle auszuschleusen. Freigesetzt werden u.a. Plättchenfaktor 3 und 4, 5-HT, ADP und ATP, Plättchenfibrinogen etc.

Vor allem das freigesetzte ADP leitet nun die 3. Stufe, die reversible Aggregation, ein. Diese geht durch Anlagerungen

kleiner Mengen Thrombin auf der Plättchenoberfläche kontinuierlich in das Stadium der irreversiblen Aggregation - oder auch visköse Metamorphose genannt - über. Da Thrombin ein sehr potenter Stimulator der Freisetzungsreaktion ist, kommt es durch positive Rückkoppelung zu einer Selbsterhaltung und Beschleunigung der irreversiblen Aggregation. Der Aggregationsprozeß läuft nun selbständig bis zum Ende, d.h. bis zum Aufbrauch aller intakten zirkulierenden Thrombozyten, ab.

Dieser zeitliche Ablauf der Thrombozyten-Aggregation kann durch kontinuierliche Messung der Lichttransmission im Aggregometer registriert und mit einem Kompensationsschreiber aufgezeichnet werden (29,62,65).

Das WAS zählt zu den sog. "storage pool diseases", bei welchen die Adrenalin-induzierte Thrombozyten-Aggregation nur zu einer einphasigen Aggregationskurve führt. Auch die Thrombozyten WAS-Heterozygoten zeigen unter optimalen Bedingungen nur ein monophasisches Aggregogramm (siehe S. 16).

III. Theoretische Grundlagen des Heterozygotentests nach SHAPIRO et al. (59)

1. Plättchen-Energiemetabolismus bei WAS und WAS-Heterozygoten

Wie bereits erwähnt (siehe S. 2) fällt das WISKOTT-ALDRICH-Syndrom (WAS) unter anderem durch eine schwere Blutungsneigung auf, welche neben einer Verminderung der Plättchenzahl auch auf einen Plättchendefekt zurückzuführen ist (9 , 18 , 24 , 34 , 36). Der Defekt zeigt sich in einer mikrozytären Thrombopenie (normalerweise weniger als 50000/u1), in einer kurzen Plättchen-Überlebenszeit und in sehr niedrigen endogenen ADP- und ATP-Spiegeln in den Thrombozyten (5 , 26 , 35 , 36). Trotzdem ist die genaue Ursache des thrombozytären Defekts noch unsicher, da u.a. sowohl die Thrombozytopenie als auch die reduzierte Plättchengröße präzise Untersuchungen erschweren.

Ein alternatives Vorgehen, den Plättchendefekt zu erforschen, sind Untersuchungen an Heterozygoten dieser Erkrankung, die normalerweise keine Thrombopenie haben. Ausreichend hohe Spiegel an Plättchen-ATP sind zur Auslösung einer zweiten Welle bei der Adrenalin-induzierten Aggregation notwendig (siehe S. 11 ff). Die ATP-Synthese ist von einer intakten Glykolyse und einer intakten oxidativen Phosphorylierung abhängig, wobei die Blockierung einer der beiden Stoffwechselwege allein (für kurze Zeit) nur einen geringen oder keinen Einfluß auf eine normale Aggregation hat, da die Stoffwechselwege sich gegenseitig vertreten können (41,57).

SHAPIRO et al. fanden in ihrer Untersuchung, daß auch die Thrombozyten der WAS-Heterozygoten eine defekte Glykolyse haben. Werden die Plättchen dieser Heterozygoten

nur mit einem Stoffwechselblocker der oxidativen Phosphorylierung inkubiert, so aggregieren sie mit Adrenalin wie normale Thrombozyten zweiphasig. Werden die Plättchen dagegen mit einem Stoffwechselblocker der Glykolyse inkubiert, so erhält man konzentrationsabhängig ein pathologisches einphasiges Aggregogramm; der gleiche Versuch mit normalen Thrombozyten gesunder Spender führt zu einer zweiphasigen Aggregation. Werden diese normalen Thrombozyten jedoch noch zusätzlich mit einem Stoffwechselblocker der oxidativen Phosphorylierung inkubiert, so erhält man pathologische einphasige Aggregogramme, ähnlich derer von WAS-Heterozygoten.

Dieses Phänomen bot für SHAPIRO et al. eine Grundlage zur Entwicklung eines neuen Suchtests für WAS-Überträgerinnen und zusätzlich eine Möglichkeit zur Erforschung ursächlicher biochemischer Defekte beim WAS.

2. Stoffwechselblocker: 2-Deoxy-D-Glukose (DDG) und Antimycin A (Ant A)

Als Stoffwechselblocker für die Glykolyse verwendeten SHAPIRO et al. (59) 2-Deoxy-D-Glukose (DDG); für die oxidative Phosphorylierung das Antimycin A (Ant A).

PUMPHREY (53) untersuchte die Wirkung des Ant A auf das Cytochrom B, ein an der Atmungskette beteiligtes Enzym zur Elektronenübertragung. Unter anderem fand er, daß Ant A die Atmungskette über das Cytochrom B blockiert und daß das Ant A in einer stöchiometrischen Beziehung zu Cytochrom B steht. Das molare Verhältnis, das zur Blockierung ausreicht, ist wahrscheinlich 1 : 2, d.h. ein Ant A blockiert zwei Cytochrom B.

Über das Glukose-Analog DDG arbeitete WEBB (67). Er kam unter anderem zu folgenden Ergebnissen:

1. DDG blockiert kompetitiv gewisse Hexokinasen.
2. DDG interferiert möglicherweise mit dem aktiven Transport anderer Hexosen ins Zellinnere.
3. Blockierung der Phosphoglukoseisomerase durch DDG, welches durch eine Hexokinase bereits phosphoryliert wurde.
4. Sekundäre Verminderung des Hexose-Transports und der Hexosephosphorylierung durch Entleerung der ATP-Speicher.
5. Etliche weitere metabolische und systemische Wirkungen von DDG wurden beschrieben.

Die Beeinflussung der Plättchenfunktion durch DDG und Ant A und deren Wirkung auf den Plättchen-Energiemetabolismus untersuchten MÜRER et al. (41), unter anderem an der ADP-induzierten Aggregation. Die Glykolyse blockierten sie durch DDG, die mitochondriale Energieproduktion wurde durch Ant A blockiert. Jedes Reagenz allein hatte keinen Einfluß auf das Aggregationsverhalten, beide zusammen jedoch verringerten die Aggregationsamplitude deutlich. Die Schlußfolgerung MÜRERs et al.: Die Energieproduktion der Thrombozyten kann allein entweder durch die Glykolyse oder durch die oxidative Phosphorylierung aufrechterhalten werden.

ROZENBERG u. HOLMSEN (57) stellten durch Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Adenin fest, daß die Nukleotidbildung in Thrombozyten durch Stoffwechselblockade mit Ant A und DDG gemeinsam um 80 % reduziert wird. Durch die Blockade mit nur einem Reagenz wird die Nukleotidbildung kaum oder nicht vermindert.

In einer umfangreichen Arbeit bestätigten HOLMSEN et al. (29) die Ergebnisse ROZENBERGs u. HOLMSENS im wesentlichen und zeigten die Wirkung der Stoffwechselblockade mit Ant A und DDG bei der Adrenalin-induzierten Aggregation. Nach

einer 15-minütigen Inkubation der Thrombozyten bei 37°C mit beiden Reagentien wurde die zweite Welle der Adrenalin-induzierten Aggregation komplett inhibiert. HOLMSEN et al. fanden, daß Ant A und DDG zwar die metabolischen ATP-Speicher der Thrombozyten zu entleeren scheinen, daß sie aber keinen oder nur einen geringen Effekt auf den nicht-metabolischen ATP-pool (storage pool) haben (siehe auch S. 12).

3. SHAPIROs et al. Ergebnisse und Diskussion

1. Patienten- und Kontrollkollektiv:

SHAPIRO et al. konnten 8 sichere und 2 mögliche WAS-Heterozygote mit ihrem Test untersuchen. Die sicheren Heterozygoten waren definiert als Frauen, die entweder zwei erkrankte Buben zur Welt gebracht hatten oder die nur einen erkrankten Buben geboren und in der Verwandtschaft einen weiteren Erkrankungsfall aufzuweisen hatten. Als mögliche Heterozygote waren die Frauen definiert, die nur einen erkrankten Buben zur Welt gebracht hatten und in deren Verwandtschaft kein weiterer Erkrankungsfall aufgetreten war. Als Kontrollgruppe dienten 10 gesunde Frauen ohne Blutungsprobleme in der Anamnese. Beide Gruppen hatten die letzten 10 Tage vor der Untersuchung keine Medikamente eingenommen und 2 Stunden vor Blutentnahme nichts gegessen.

2. Ergebnisse:

Das plättchenreiche Plasma (PRP) sowohl der Kontrollgruppe als auch der Patientengruppe zeigte bei der Adrenalin-induzierten Aggregation ohne Stoffwechselblockade jeweils einen biphasischen Aggregationsverlauf. Nach Inkubation des PRP mit 0,8 µg/ml Ant A für 15 min. bei 37°C wurde bei keiner der untersuchten Frauen die zweite Welle blockiert.

Bei der alleinigen Inkubation des PRP mit DDG (45 mmol/l) für 15 min. bei 37 ° C zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen Kontroll- und Patientengruppe. Die Kontrollgruppe hatte nach wie vor ein normales biphasisches Aggregationsmuster; hingegen hatten die sicheren Heterozygoten durchwegs ein monophasisches Aggregationsmuster.

3. Diskussion der Ergebnisse von SHAPIRO et al.:

Der Stoffwechselblocker DDG verursacht einen wiederholbaren Defekt bei der Adrenalin-induzierten Plättchenaggregation -von WAS-Heterozygoten. Aufgrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, daß WAS-Überträger im ATP-Metabolismus der Thrombozyten einen Defekt haben, möglicherweise einen Enzymdefekt im Stoffwechselweg der oxidativen Phosphorylierung. Auch der Immundefekt beim WAS könnte nach Meinung SHAPIROs et al. auf einen gestörten ATP-Metabolismus zurückgeführt werden.

IV. Beschreibung der eigenen Methode

1. Material und Reagentien

- 1) Photometer: Zur Messung der Thrombozyten-Aggregation wurde das Photometer, Modell 1101 M (Fa. Eppendorf), mit dem Universal-Aggregometer-Aufsatz (Fa. Braun - Melsungen AG) versehen. Die Aufzeichnung der Aggregationskurven wurde mit dem Einkanal-Kompensationsschreiber, Modell 5200-0 (Fa. Braun - Melsungen AG) geschrieben.
- 2) Kunststoff-Einmalmeßröhrchen (Polystyrol) (Fa. Braun - Melsungen AG).
- 3) Magnet-Rührstäbchen, teflonbeschichtet, 6 mm lang, 3 mm Ø, mehrfach zu verwenden.
- 4) Glasfilter Hg 546 für Photometer.
- 5) Wärmebad, auf 37°C temperierbar.
- 6) Graduierte Glaspipetten verschiedener Volumina, Einmal-Pasteurpipetten mit Gummiballon, Polystyrol-Einmalröhrchen für die Zentrifugation zur Herstellung von PRP und PPP (platelet poor plasma = plättchenarmes P.)
- 7) Zentrifuge mit variabler Beschleunigung (250g - 1000g) (Rotanta/S von Fa. Hettich)
- 8) Möglichkeit zur Zählung von Thrombozyten im Nativblut und im PRP bzw. PPP, z.B. mit Mikroskop (Methode: FEISSLY-LÜDIN modifiziert nach DERLATH, (64)), Thrombo-Plus-Röhrchen (Fa. Saarstedt), 50 µl EDTA-Einmalpipetten, Neugebauer-Kammer, feuchte Kammer (z.B. Petrischale), Phasenkontrastmikroskop.

- 9) Suprarenin^R Hoechst (= stabilisiertes Adrenalin).
- 10) TRIS-Puffer 0,1 M, pH 9,0.
- 11) 2-Deoxy-D-Glucose (No. D-6134 Grade 3, Fa. Sigma chemical company).
- 12) Hank'sche Lösung, pH 7,4, ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺
(Herstellung in der Apotheke).

2. Reinigung

Wegen der leichten Irritierbarkeit der Adrenalin-induzierten Thrombozyten-Aggregation empfiehlt es sich, nach Möglichkeit nur Einmal-Materialien zu verwenden. In manchen Fällen ist dies jedoch nicht möglich oder zu unwirtschaftlich, z.B. bei Pipetten oder Rührmagneten für die Aggregation. Hier sind diese Geräte mit Chromschwefelsäure zu reinigen, anschließend mehrfach mit Aqua bidestillata zu waschen und zu trocknen.

3. Herstellung der gebrauchsfertigen Lösungen

a) 1 g DDG (2-Deoxy-D-Glucose) wird in 2,666 ml Hank'scher Lösung (pH 7,4 ohne Ca⁺⁺ und Mg⁺⁺) gelöst. Das heißt: 20 µl Volumen dieser Lösung entspricht einer Endkonzentration von 45 mmol/l DDG. Zweckmäßigerweise wird diese Stammlösung in kleinere Volumina aufgeteilt, dicht verschlossen und bei ca. -18° C im Tiefkühlschrank gelagert.

b) Adrenalin zum Starten der Aggregationsreaktion:

20 µl Suprarenin^R Hoechst werden zu 2 ml TRIS-Puffer (pH 9,0 / 0,1 molar) gegeben. Dies entspricht einer End-

konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ bei einem Volumen von 100 μl . Die Starterlösung muß für jede Reaktion neu gemischt werden und innerhalb von 60 sec verwendet werden.

4. Blutentnahme

Es werden ca. 20 - 30 ml Citratblut für die Aggregationsmessungen benötigt: 1 Teil Natriumcitrat 3,8 %, 9 Teile venöses Blut. Mit den zuvor mit Na-Citrat auf die entsprechende Menge aufgefüllten Einweg-Spritzen wird mit einer großlumigen Blutentnahmekanüle unter schonenden Bedingungen und bei nicht zu lange dauernder Oberarmstauung (mit einer Staubinde) eine Armvene punktiert. Mit sehr geringem Sog (möglichst schonend) wird das Blut aus der Vene entnommen und in die Zentrifugen-Röhrchen umgefüllt.

5. Zentrifugation und Thrombozytenzählung

Im Folgenden sind die Zentrifugalbeschleunigungen in g angegeben. Zur Umrechnung in die praktischen Werte U/min eignet sich nachstehende Formel, wobei g die gewünschte Zentrifugalbeschleunigung und r den mittleren Radius des Zentrifugenarmes bedeutet.

$$U/\text{min} = \sqrt{\frac{g}{1,118 * 10^{-5} * r}}$$

a) Gewinnung von PRP (platelet rich plasma):

Das Citratblut wird für 15 min bei 250 g zentrifugiert. Der Überstand, ein gelblich trübes Plasma (die Trübung rührt vom TYNDALL - Effekt der suspendierten Thrombozyten her), wird mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dies sollte

besonders vorsichtig geschehen, da durch die Wirbelbildung beim Absaugen die nur leicht sedimentierten Erythrozyten und der buffy-coat das PRP verunreinigen könnten. Das so gewonnene PRP wird nun bei Raumtemperatur für 15 - 30 min in einem Einmal-Reagenzglas aus Kunststoff gelagert.

b) Gewinnung von PPP (platelet poor plasma):

Sobald das PRP abgezogen ist, wird das verbleibende Erythrozytensediment nochmals für 15 min bei 1000 g zentrifugiert. Der Überstand - jetzt normalerweise gelblich klar - ist annähernd frei von den korpuskulären Blutbestandteilen. Er dient im Folgenden lediglich als Leerwert für die Photometereichung.

c) Thrombozytenzählung im PRP:

50 μ l PRP werden mit einer geeichten Glaskapillare abgezogen, in ein Thrombo-plus-Röhrchen geblasen und gemischt. Einen Tropfen dieser Suspension füllt man in eine Neubauer-Kammer. Diese wird für mindestens 10 min in eine feuchte Kammer gestellt. Nach dieser Zeit, die zur Sedimentation der Thrombozyten in eine Ebene notwendig ist, kann mit der mikroskopischen Auszählung von 5 mittleren Quadraten begonnen werden. Das Ergebnis mit 2000 multipliziert ergibt die Zahl der Thrombozyten/mm³ Plasma.

6. Beschreibung des Aggregationsmeßplatzes

Der Aggregationsmeßplatz besteht aus einem Eppendorf - Photometer 1101 M, das durch den Universal-Aggregometer-Aufsatz von Braun-Melsungen zu einem vollwertigen Aggregometer umgebaut wurde. Der Aggregationsverlauf wird mit einem Einkanal-Kompensationsschreiber registriert. Abb.2 zeigt die funktionellen Einheiten des Aggregationsmeßplatzes.

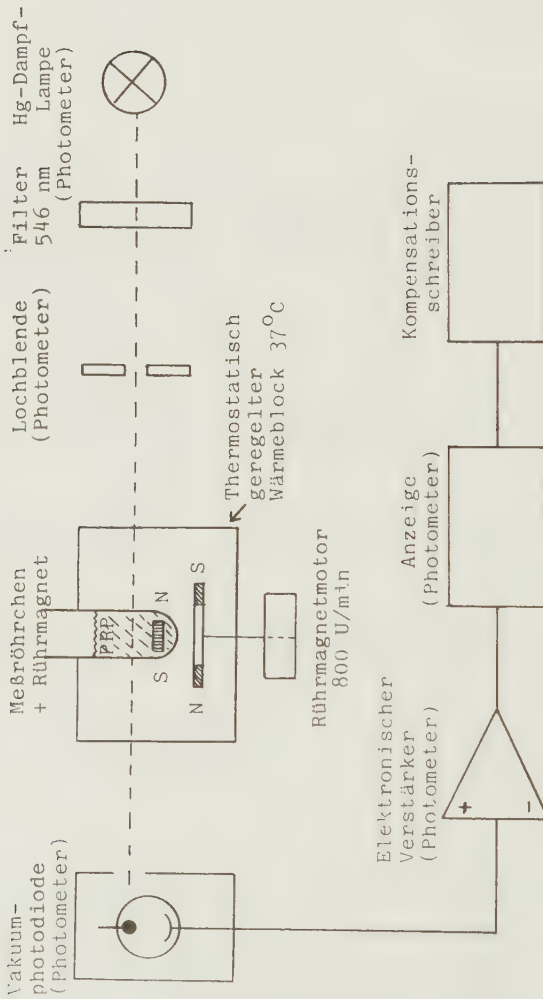


Abb. 2:

Funktionsprinzip des verwendeten Aggregometers
(modifiziert nach BREDDIN et al. (10))

7. Eichung des Photometers und des Kompensationsschreibers

0,9 ml des PPP werden in ein Einmal-Aggregometer-Röhrchen mit teflonbeschichtetem Magneten gefüllt und in den vorgewärmten (37°C) Meßblock des Aggregometers gesteckt. Das Aggregometer muß auf "Rühren" stehen. Jetzt wird durch die Öffnung im Aggregometerdeckel 100 μl Adrenalin-TRIS-Puffer-Gemisch zugegeben. Mit der Grob- und Feineinstellung am Photometer wird die Lichtmarke auf 0-Extinktion bzw. 100 % Transmission eingestellt. Mit dem Nullabgleich des Kompensationsschreibers wird der Schreibstift auf die Papier-Nulllinie eingestellt.

Um die Vergleichbarkeit der Aggregogramme verschiedener Probanden zu ermöglichen, muß auch der PRP-Wert geeicht werden. Abfüllen und Beschicken des Röhrchens wird wie bei PPP - jedoch ohne Adrenalin-Puffer-Gemisch - vorgenommen. Der Stift des Kompensationsschreibers wird sodann durch ein Wendepotentiometer am Aggregometer auf die Papierlinie 900 eingestellt. Diese Eichung ist vor jeder Messung durchzuführen. Die Einstellung des 0-Wertes genügt einmal zu Beginn einer Versuchsreihe. Die Vorschubgeschwindigkeit des Schreibers wird auf 2,5 cm/min festgelegt.

8. Versuchsplan

Der genaue Versuchsplan ist Tab.1 zu entnehmen.

Probe Nr.1 dient zur Überprüfung, ob die Thrombozyten des jeweiligen Probanden mit Adrenalin überhaupt zu aggregieren sind. Läßt sich keine Aggregation auslösen - auch nicht mit der 5-fachen Menge Adrenalin - dann ist der

Aggregationstest nicht anwendbar.

Proben Nr.2 bis Nr.8 dienen der Erkennung der Thrombozyten-funktionsstörung und somit der Differenzierung heterozygot/nicht heterozygot.

Probe Nr.9 benötigt man wiederum für eine Kontrollaggregation, um gegebenenfalls Alterungsartefakte (d.h. Lagerungsartefakte) beim PRP zu erkennen. Eine fehlende 2. Welle im Aggregogramm schließt eine Beurteilung der vorangegangenen Aggregationen auf Heterozygotie aus.

Probe Nr.10 dient der einmaligen Eichung des Photometers auf 100 % Transmission zu Versuchsbeginn.

Probe Nr.	PRP(ml)	Adrenalin ($\mu\text{mol/l}$)	DDG $\hat{=}$ (mmol/l)	μl Stammlösung	
				1 : 1	1:10
1	0,9	5,0	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
2	0,9	5,0	9,0	$\emptyset$	40
3	0,9	5,0	4,5	$\emptyset$	20
4	0,9	5,0	2,25	$\emptyset$	10
5	0,9	5,0	1,125	$\emptyset$	5
6	0,9	5,0	22,5	10	$\emptyset$
7	0,9	5,0	45,0	20	$\emptyset$
8	0,9	5,0	90,0	40	$\emptyset$
9	0,9	5,0	$\emptyset$	$\emptyset$	$\emptyset$
10	0,9 PPP + 100 μl Adrenalin-TRIS-Puffer-Gemisch als Leerwert				

Tab.1:

Versuchsplan (modifiziert nach SHAPIRO et al. (59))

9. Vorbereitung der Aggregationsröhrchen

Zweckmäßigerweise werden die Röhrchen schon vor der Blutentnahme vorbereitet, da die Aggregationen möglichst schnell hintereinander durchgeführt werden sollen, um die Aggregabilität vergleichbar zu halten. 10 Einmal-Aggregationsröhrchen werden entsprechend dem Versuchsplan durchnummeriert und mit den teflonbeschichteten Magneten bestückt.

10. Inkubation des plättchenreichen Plasma (PRP) mit oder ohne Stoffwechselblocker vor der Aggregation

Frühestens 30 min nach der Blutentnahme inkubiert man das Röhrchen Nr.1 mit 0,9 ml PRP für 15 min im 37°C warmen Wasserbad. Alle 5 min wird dem Versuchsplan entsprechend das jeweilige Röhrchen mit 0,9 ml PRP gefüllt und mit der festgelegten Menge DDG inkubiert. Im Versuchsplan (Tab.1) sind in den beiden rechten Spalten die den benötigten Konzentrationen entsprechenden Volumina in μ l angegeben.

Erscheint bei der Aggregation des Röhrchens Nr.2 bereits keine 2. Welle mehr, werden nur die Aggregationsmessungen aus den Röhrchen bis einschließlich Nr.5 und dann noch Nr.9 vorgenommen. Zeigt sich jedoch bei Röhrchen Nr.2 ein zweiwelliges Aggregogramm, so kann bei Nr.6 weitergemacht werden. Diese Hinweise sollen nur der Verkürzung des Tests dienen; die Untersuchungen Nr. 3 bis Nr. 5 bringen dann keine zusätzliche Information.

11. Aggregation des PRP durch Adrenalin

Das jeweilige Röhrchen wird aus dem Wasserbad genommen, durch Beklopfen kurz aufgeschüttelt, außen getrocknet

und in den auf 37°C temperierten Meßblock des Aggregometers gesteckt. Nun wird das Adrenalin-Puffer-Gemisch im 100 µl Volumen zum PRP gegeben. Die Verdünnung macht sich durch eine geringfügige Erhöhung der Transmission bemerkbar. Nach einer Latenzzeit von meist mehreren Sekunden zeigt sich die sog. 1. Welle durch eine stärkere Erhöhung der Transmission. Im Anschluß daran kann sich noch eine sog. 2. Welle anschließen, die sich durch eine Näherung der Transmission an den 100 % - Wert zeigt. (siehe auch Abb.3 und Abb.4)

Kritisch ist die Herstellung des Adrenalin-TRIS-Puffer-Gemisches. Da Adrenalin im alkalischen Milieu instabil ist und die Wirksamkeit stetig geringer wird, ist eine Neuherstellung des Gemisches vor jeder Aggregationsauslösung notwendig. Kurz vor der Aggregation werden zu 2 ml TRIS-Puffer (pH 9,0; 0,1 M) 20 µl Suprarenin^R Hoechst hinzugefügt; das Gemisch wird mehrmals gekippt. Sodann werden 100 µl dieses Gemisches zum PRP im Aggregometer gegeben. Dieses Volumen entspricht einer Endkonzentration von 5,0 µmol Adrenalin/l.

12. Auswertung der Aggregationskurven

Bei der Adrenalin-induzierten Aggregation des PRP von Normalpersonen zeigt sich, wie oben bereits beschrieben, als Funktion der Zeit normalerweise eine biphasische Erhöhung der Transmission. Meist sind beide Phasen durch ein mehr oder weniger langes Plateau getrennt. Abb.3 zeigt eine solche biphasische Aggregationskurve.

Auch bei WAS-Heterozygoten lassen sich mit dieser Aggregationsmethode zweiphasige Aggregationskurven auslösen. Der Unterschied zu gesunden Kontrollpersonen besteht darin, daß zur Blockierung der 2. Welle wesentlich niedrigere DDG-Konzentrationen notwendig sind. Die Konzentration an

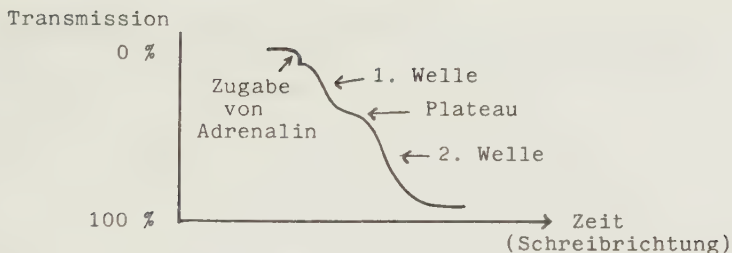


Abb. 3:
Biphasische Aggregationskurve

DDG, die gerade ausreicht, um die 2. Welle zu unterdrücken, wird "minimale Hemmkonzentration DDG" genannt. Sie ist bei WAS-Heterozygoten mindestens um den Faktor 2 niedriger als bei Normalpersonen. Aufgrund dieses Kriteriums wird entschieden, ob die getesteten Thrombozyten einen defekten Energiestoffwechsel besitzen, d.h. nach SHAPIRO et al. typisch für WAS-Heterozygote sind. Eine Aggregationskurve, bei der die 2. Welle blockiert ist, ist in Abb.4 dargestellt.

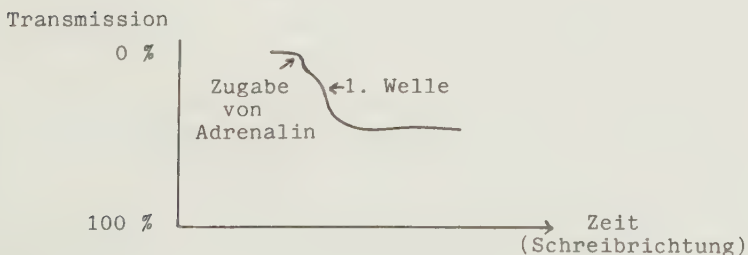


Abb. 4:
Monophasische Aggregationskurve

V. Eigene Voruntersuchungen zur Verbesserung der Aggregabilität durch Adrenalin

1. Literaturübersicht

Hauptvoraussetzung zur Durchführung des Heterozygotentests nach SHAPIRO et al. (59) ist es, die 2. Welle der Adrenalin-induzierten Aggregation ohne Stoffwechselblockade der Thrombozyten zu erreichen. Ist diese Voraussetzung nicht gegeben, so ist der Proband bzw. die Heterozygote mit diesem Test nicht testbar.

Übereinstimmend mit mehreren Arbeiten zur Adrenalin-induzierten Aggregation (10,11,12,27,39,47,55,58,66) konnte auch bei uns nur in ca. 2/3 der untersuchten PRP gesunder Probanden eine 2. Welle registriert werden. O'BRIEN (47) berichtet von einer 30%-igen Versagerquote, wobei er bei wiederholten Versuchen mit gleichen Probanden feststellte, daß das Ergebnis der Messungen einer Adrenalin-induzierten Aggregation - sei es nur 1. Welle oder 1. und 2. Welle - bei den meisten der Untersuchten innerhalb eines Tages reproduzierbar waren, daß aber innerhalb eines Monats die Ergebnisse nicht mehr konstant reproduziert werden konnten. Dieses Phänomen beschrieb er als "variability" der Adrenalin-induzierten Aggregation. SCHWARTZ u. ARDLIE (58) erhielten als typische Antwort auf Adrenalin eine monophasische Aggregationskurve, nur gelegentlich eine biphasische. Auf der Suche nach der Ursache der "variability" fanden HARRISON et al. (27) eine nur unwesentliche Beeinflussung der Aggregabilität durch die Blutentnahme-Methodik, jedoch eine nicht zu vernachlässigende Änderung der Aggregabilität durch geistigen oder körperlichen Stress (z.B. Operationen) und durch den Zeitpunkt der Aggregationsmessung nach der Blutentnahme. Sofort nach Blutentnahme getestetes PRP zeigte eine weitaus geringere Aggregations-

aktivität als PRP, das eine Stunde bei Raumtemperatur gelagert und dann erst getestet wurde. Die biochemische Ursache dieses - von HARRISON et al. (27) "plasma instability" genannten - Phänomens konnte von diesen Autoren nicht geklärt werden. Genauer haben BREDDIN et al. (11,12) den Einfluß des Intervalls zwischen Blutentnahme und Adrenalin-induzierter Aggregation untersucht. Aufgrund ihrer Studien geben sie die Empfehlung, bei der Suche nach thrombozytären Defekten die Aggregationsmessung erst eine Stunde nach Blutentnahme vorzunehmen, da bei zeitlich früher durchgeführter Aggregation gehäuft falsch positive Ergebnisse beobachtet wurden.

MACMILLAN (39) suchte nach der Ursache für die 2. Welle der Plättchenaggregation und fand, daß dieses Phänomen sowohl von der Konzentration der Plättchen im PRP als auch von der Konzentration des Aggregationsauslösers Adrenalin, darüber hinaus auch von noch nicht näher definierten Eigenschaften der Thrombozyten abhängig ist. Eine direkte Beziehung zwischen dem pH des PRP und der Fähigkeit zur 2. Welle stellte ROGERS (55) fest. Der pH des PRP stieg nach längerem Stehen von anfangs 7,6 auf 8,0. Festzuhalten war, daß mit steigender Alkalose die 2. Welle stärker ausgeprägt war. Anfängliche Versuche mit verschiedenen Pufferlösungen zur Alkalisierung des PRP scheiterten. Die Äquilibrierung des PRP-pH mittels Durchströmung des PRP mit CO_2 gestattete schließlich die Imitierung des natürlichen Effekts der pH-Änderung auf die Aggregabilität des PRP. Dadurch wurde nachgewiesen, daß bei einem pH von 7,2 bis 7,5 keine 2. Welle zu erhalten ist, bei einem pH von 7,7 bis 7,8 in der Regel jedoch innerhalb von 3 Minuten eine 2. Welle induziert wird. Die Schlußfolgerung von ROGERS (55): Die endogene ADP-Freisetzungsreaktion der Thrombozyten - das biochemische Korrelat der 2. Welle - läßt sich durch den pH des PRP beeinflussen. Als Hypothesen stellte ROGERS (55) eine Änderung der Oberflächen-

ladung der Thrombozyten oder eine Änderung im c-AMP-Metabolismus in den Raum. Die pH-Änderung in alkalische Richtung wurde von BREDDIN et al. (10) als das entscheidende Kriterium zur Auslösung der spontanen Thrombozyten-Aggregation (durch CO_2 -Abgabe des PRP) beschrieben. Schließlich empfahlen WARLOW et al. (66) aufgrund einer Testreihe mit 10 Probanden, die Plättchen-Aggregationsmessung nicht früher als 60 Minuten nach Blutentnahme durchzuführen.

Persönliche Rückfragen im Labor von SHAPIRO (SPECTOR (60)) und bei NEDELLEC in Paris (45,46), die ebenfalls mit dem Heterozygotentest arbeiten, bestätigten die Unzuverlässigkeit der Adrenalin-induzierten Aggregation als eines der Hauptprobleme. SHAPIRO und seine Mitarbeiter versuchten das Problem durch Erhöhung der Adrenalinkonzentration auf bis zu $100 \mu\text{mol/l}$ zu lösen. NEDELLEC berichtete von einer Versagenquote von ca. 50 % wegen der Unzuverlässigkeit der Adrenalin-induzierten Aggregation. Auch BROCKHAUS in Nürnberg (13) hat ähnlich hohe Versagerquoten.

2. Reduzierung der Unzuverlässigkeit der Adrenalin-induzierten Plättchenaggregation

Die Gedanken von ROGERS (55) und BREDDIN et al. (10) aufgreifend wurde von uns der pH-Wert des TRIS-Puffers variiert. Der untersuchte Bereich erstreckte sich von pH 6,5 bis pH 9,0. Zur Quantifizierung der Aggregabilität wurde die Steigung der 2. Welle als Tangens α_2 gemessen. Die Versuchsbedingungen entsprachen den in Kap.IV beschriebenen. Es stellte sich heraus, daß die Steilheit der 2. Welle mit steigendem pH-Wert deutlich größer wurde. In Abb.5 ist das Ergebnis graphisch dargestellt.

Ein zweiter Versuch sollte klären, ob die Ergebnisse nur auf pH-Änderungen oder auch auf spezifischen Wirkungen

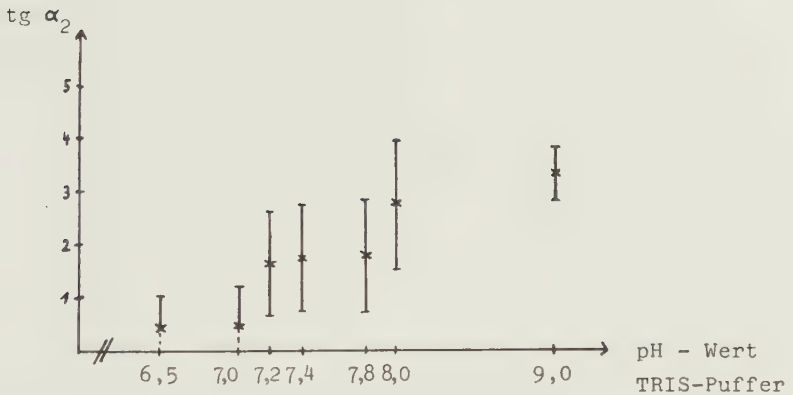


Abb. 5:

Mittelwert und Standardabweichung ($n = 4$) der Steilheit der 2. Welle ($\text{tg } \alpha_2$) in Abhängigkeit vom pH-Wert des TRIS-Puffers. Nur ein Tangens größer 1,5 kann als 2. Welle gewertet werden.

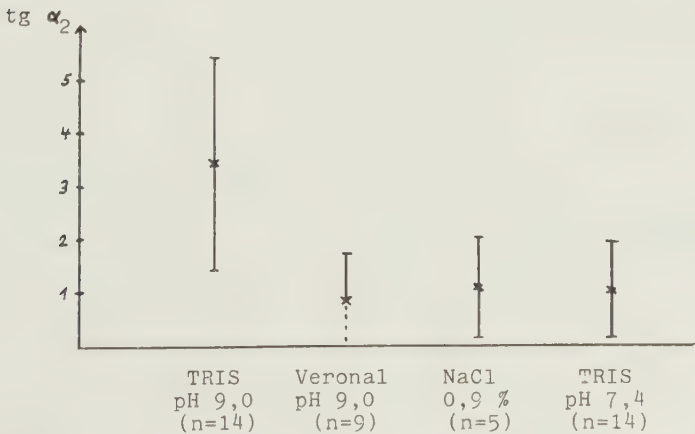


Abb. 6:

Mittelwert und Standardabweichung der Steilheit der 2. Welle ($\text{tg } \alpha_2$) in Abhängigkeit von verschiedenen Adrenalin-Lösungsmitteln.

des TRIS-Puffers beruhten. Zu diesem Zweck wurden die Effekte der Adrenalinlösungsmittel TRIS-Puffer, Veronal-Puffer (beide pH 9,0) und als Kontrolle die Wirkung der Lösungsmittel NaCl (0,9 %) und TRIS-Puffer (pH 7,4) auf die Steigung der 2. Welle verglichen. Wie in Abb.6 zu erkennen ist, ließ sich nur mit TRIS-Puffer (pH 9,0) mit Sicherheit eine 2. Welle auslösen. Mittels eines t-Test für unabhängige Stichproben (17) wurde der Mittelwertsunterschied des Tangens α_2 zwischen TRIS pH 9,0 und TRIS pH 7,4 auf Signifikanz überprüft. Dabei ergab sich ein Signifikanzniveau von 0,05 %.

Wegen dieser deutlichen Reduzierung der Unzuverlässigkeit der Adrenalin-induzierten Aggregation durch Verwendung eines alkalischen TRIS-Puffers wurde zur Durchführung des Heterozygotentests im Gegensatz zu SHAPIRO und NEDELLEC ein TRIS-Puffer mit pH 9,0 verwendet.

Da jedoch Katecholamine nur im saueren Milieu chemisch stabil sind, andererseits aber auf den Effekt des alkalischen TRIS-Puffers nicht zu verzichten war, war es notwendig, das Adrenalin-Puffer-Gemisch vor jeder Aggregation neu herzustellen und innerhalb von 60 sec zu verwenden. Abb.7 zeigt das Verhalten des Tangens α_2 (2 Probanden) bei Start der Aggregation mit frisch angesetzter Adrenalin-Puffer-Lösung und mit bis zu 10 Minuten alter Lösung. Es ist der deutliche Trend zu erkennen, daß das alkalische Adrenalin-Puffer-Gemisch bei einer Lagerung von mehr als 60 sec an Aggregationspotenz verliert.

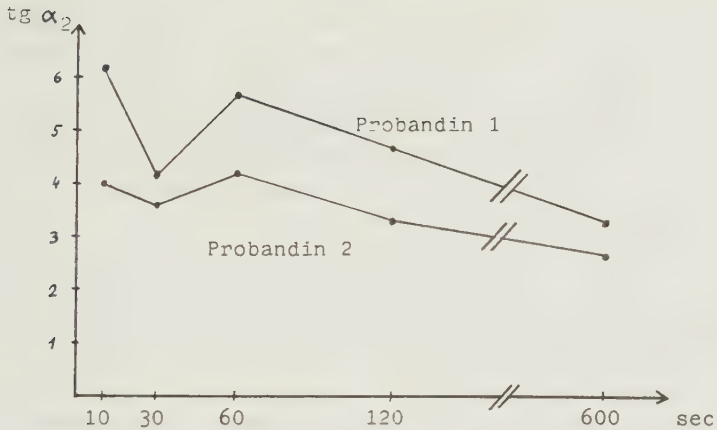


Abb.7:

Steigung der 2. Welle ($\text{tg } \alpha_2$) in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer des Adrenalin-Puffer-Gemisches vor Beginn der Aggregation (gemessen an 2 Probandinnen).

3. Diskussion der Ergebnisse zur Adrenalin-induzierten Plättchen-Aggregation

Es stellten sich drei Fragen über die Wirkungsweise des alkalischen Adrenalin-Puffer-Gemisches:

1. Ist die Wasserstoffionenkonzentration allein ausschlaggebend für die Verbesserung des Aggregationsverhaltens?
2. Sind die beobachteten Effekte nur Wirkungen des alkalierten TRIS-Puffers?
3. Entstehen Adrenalinmetabolite, die eine stärkere Aggregationspotenz besitzen als Adrenalin alleine?

Wie aus Abb.6 deutlich wird, ist die Erhöhung der Steilheit der 2. Welle sicher nicht nur auf die Verminderung der H^+ -Ionen zurückzuführen, gleich welcher Puffer verwendet

wird. Der Mittelwertsunterschied auf einem Signifikanzniveau von 0,1 % zwischen dem TRIS-Puffer pH 9,0 und dem Veronalpuffer pH 9,0 läßt vermuten, daß der TRIS-Puffer an sich eine spezifische Wirkung haben muß. Es genügt also nicht, Adrenalin mit irgendeinem Puffer-Gemisch zu alkalisieren, sondern es muß mit TRIS-Puffer geschehen. Daß andererseits nicht nur der TRIS-Puffer, sondern auch dessen pH-Wert eine entscheidende Rolle spielt, wird aus dem Vergleich TRIS pH 9,0 und TRIS pH 7,4 in Abb.6 deutlich. Auch hier beträgt das Signifikanzniveau des Mittelwertsunterschiedes 0,1 %.

Ob Adrenalinmetabolite wirksam werden, kann aus den unternommenen Versuchen nicht sicher erkannt werden. Aus Abb.7 kann abgelesen werden, daß die Aggregationspotenz des Adrenalin-TRIS-Puffer-Gemisches bei pH 9,0 mit der Zeit (= Lagerung) sichtbar abnimmt. Auch weitere Messungen im UV-Bereich lassen beschleunigte Umbauvorgänge im Adrenalin-TRIS-Puffer-Gemisch mit steigendem pH-Wert vermuten. Die Transmissionsänderung scheint jedoch allein pH-abhängig zu sein, da - wie Abb.8 zeigt - die Kurven von TRIS-Puffer pH 9,0 und Veronalpuffer pH 9,0 gleich steil verlaufen. Auch im neutralen Bereich mit NaCl 0,9 % und TRIS-Puffer pH 7,15 ist die Steigung der Kurven vergleichbar. Im physiologischen Bereich ist über 10 Minuten praktisch keine Transmissionsänderung zu bemerken. Hingegen zeigt sich, daß die Transmission umso schneller zunimmt, je alkalischer der pH des Lösungsmittels ist (Abb.8). Da aber auch die Aggregationspotenz des alkalischen Adrenalin-Puffer-Gemisches über die Zeit geringer wird, ist in Zusammenschau mit den oben erwähnten Messungen im UV-Bereich eine Entstehung von wirksamen TRIS-Puffer-abhängigen Adrenalinmetaboliten eher nicht anzunehmen.

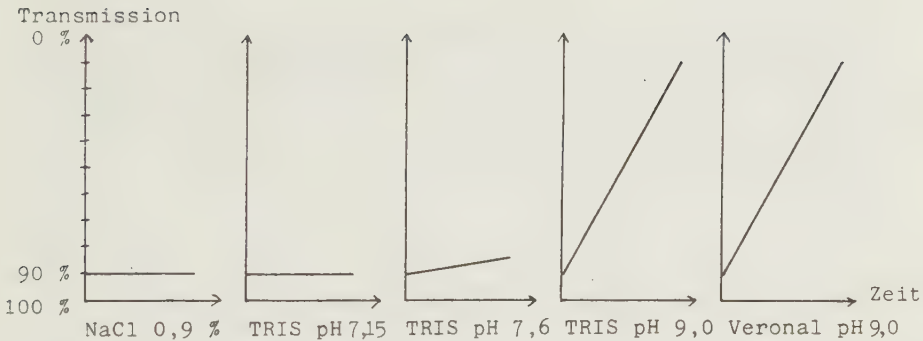


Abb.8:

Transmissionsänderung verschiedener Adrenalin-Puffer-Gemische mit unterschiedlichem pH-Wert über die Zeit, gemessen im UV-Bereich (366 nm). Es wurde jeweils 1 ml Lösungsmittel mit 100 μ l Suprarenin^R versetzt.

4. Störfaktoren der Aggregation

Eine Aggregation kann durch 1) physikalische oder auch 2) pharmakologische Einflüsse in ihrem Ausmaß beeinträchtigt oder sogar unmöglich gemacht werden.

Unter den ersten Punkt fallen alle Faktoren, die mit dem hier verwendeten Meßprinzip (Registrieren der Transmissionsänderung) interferieren. Das PRP zeigt zu Beginn der Aggregation aufgrund der Größe und Menge der suspendierten Thrombozyten einen TYNDALL-Effekt, dessen Abnahme nach Zugabe des Aggregationsauslösers photometrisch registriert wird. Nach vollständiger Aggregation ist die Klärung des PRP sogar makroskopisch gut zu sehen. So kann z.B. ein trübes chylöses Plasma oder ein mit Erythrozyten kontaminiertes PRP die Messung der Aggregation unmöglich machen (10). Luftbläschen, die sich häufig nach Inkubation im Wasserbad an den

Wänden der Meßküvette bilden, sind durch Beklopfen der Küvette zu entfernen. Durch Verwendung von Einmal-Meßröhrchen und sorgfältig gereinigten Rührmagneten können Meßstörungen durch Staub oder Schmutzpartikel weitgehend ausgeschlossen werden.

Bei den pharmakologisch bedingten Fehlerquellen stellt die häufige Einnahme von Azetylsalizylsäure (ASA) durch die Probanden das Hauptproblem dar. ROTH u. MAJERUS (56) untersuchten die biochemischen Wechselwirkungen zwischen ASA und Thrombozyten mittels radioaktiv markierter ASA. Sie fanden, daß die ASA ein Plättchenprotein azetyliert und dadurch einen dauerhaften Defekt der ASA-ausgesetzten Plättchen verursacht. Bereits 150 mg einer oralen Aspirin-Dosis reichen beim Erwachsenen aus, um diesen Defekt bis zu 10 Tagen nach Einnahme nachweisen zu können. Eine Reihe von Pharmaka, die die Plättchen-Aggregation stören könnten, gibt WEISS (71) an, z.B. Sulfinpyrazon, Dipyridamol, ASA und andere antiphlogistische Medikamente, Propranolol und andere weniger häufig rezeptierte Medikamente. SUTOR (63) beschrieb u.a. auch für folgende Pharmaka eine mögliche Beeinflussung von Thrombozytenfunktionstests: Antibiotika, Barbiturate, Furosemid, gewisse Sedativa sowie auch Alkohol. ASA kann nach ULUTIN (65) zum kompletten Verlust der 2. Welle der Adrenalin-induzierten Aggregation durch Blockierung des Glukoseenergiestoffwechsels führen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse und aufgrund eigener Erfahrungen forderten wir, daß die Probanden alle nicht lebensnotwendigen Medikamente mindestens 10 Tage vor Durchführung des Heterozygotentests absetzen. Die einzige Ausnahme bildeten orale oder parenterale Kontrazeptiva, da bei ihnen ein Absetzen zu weitreichenden sozialen und psychischen Folgen hätte führen können. Östrogene beeinflussen zwar das Aggregationsverhalten des PRP, jedoch kommt es nach Untersuchungen mehrerer Autoren (21,31,40,54) eher zu einer

Verbesserung der Plättchen-Aggregation. Probandinnen, die Kontrazeptiva einnehmen, sind folglich mit der Adrenalin-induzierten Aggregation testbar. Auch dürften nach der Theorie SHAPIROs et al. (Defekt des oxidativen Energiemetabolismus) keine falsch negativen Ergebnisse zu erwarten sein.

5. Gewinnung des plättchenreichen Plasma

Zwei Forderungen sind an die durch Zentrifugation beeinflussbare Qualität des PRP zu stellen (10):

1. Die Thrombozytenzahl sollte über $200000/\text{mm}^3$ betragen. Dies erreicht man durch eine möglichst schonende Zentrifugation mit geringer g-Zahl.
2. Die Kontamination des PRP mit Erythrozyten sollte nicht über $5000/\text{mm}^3$ liegen. Je höher die Umdrehungszahl der Zentrifuge ist, desto geringer ist die Erythrozytenkontamination, aber auch die Plättchenkonzentration.

Für unsere Versuchsreihen benötigten wir zur exakten Testung mit dem Braun-Melsungen-Aggregometer ca. 10 - 15 ml PRP. Bei etwas schärferer Zentrifugation genügten 30 ml Citratblut bei normalem Hämatokrit für eine Versuchsreihe.

Die in der Literatur beschriebenen Zentrifugalkräfte und Zentrifugierzeiten zur Gewinnung von PRP weichen stark voneinander ab (2,10,11,20,21,33,39,55,58,59,66). Der Mittelwert für Zentrifugalbeschleunigungen in obigen elf Literaturstellen beträgt 247 g bei einer Standardabweichung von 127 g (niedrigster Wert: 100 g; höchster Wert: 500g). Der Mittelwert der zugehörigen Zentrifugierzeiten liegt bei 14 min bei einer Standardabweichung von 11 min (niedrigster Wert: 1 min; höchster Wert: 40 min).

Die für unsere Verhältnisse günstigsten Resultate erhielten wir mit einer 15-minütigen Zentrifugation des Citratblutes bei 250 g. Der Mittelwert der Thrombozyten im PRP betrug $366000/\text{mm}^3$, die Standardabweichung $103000/\text{mm}^3$ ($n=31$). Makroskopisch und mikroskopisch war keine Erythrozytenkontamination zu erkennen.

Die Gewinnung des PPP (platelet poor plasma) ist unproblematisch. Die durch Zentrifugation beeinflussbare Forderung an das PPP ist allein die weitgehende Freiheit von korpulären Blutbestandteilen. So arbeiteten WARLOW et al. (66) mit einer Zentrifugalbeschleunigung von 1500 g, ELKELES et al. (21) mit 750 g; die Zentrifugierzeit betrug jeweils 15 min. Wir zentrifugierten 15 min lang mit der maximalen Umdrehungsgeschwindigkeit, was etwa 1000 g entspricht, und erhielten damit immer ein makroskopisch klares Plasma.

6. Lagerung des plättchenreichen Plasma

BREDDIN et al. (11,12) untersuchten das Aggregationsverhalten des PRP in Abhängigkeit von verschiedenen Lagerungstemperaturen. Nach dieser Studie hatte eine Lagerung bei Raumtemperatur (25°C) den geringsten negativen Einfluß auf die Aggregabilität. Sowohl bei 4°C als auch insbesondere bei 37°C war das Adrenalin-induzierte Aggregationsverhalten deutlich verschlechtert. Im Gegensatz dazu arbeitete MACMILLAN (39) mit gutem Erfolg mit einer Lagerungstemperatur von 37°C . Die meisten Autoren (25,58,59,66) jedoch bevorzugten wie BREDDIN et al. eine Lagerungstemperatur von 25°C . Diesen Autoren folgend lagerten wir das PRP ebenfalls bei Raumtemperatur.

VI. Thrombozyten-Volumen-Verteilung (TVV)

Die Messung der TVV wurde unter Leitung von Dr. P. HELLSTERN in der Abteilung für Hämostaseologie der Universitätskliniken Homburg/Saar durchgeführt. Die Blutprobe wurde in einem Arbeitsgang mit der Blutentnahme für den Heterozygotentest aus einer Armvene entnommen und mit 5 %igem EDTA im Verhältnis 1 : 10 antikoaguliert. Bis zum Bahnversand nach Homburg/Saar wurde sie bei +4°C gelagert; der Versand selbst wurde ungekühlt ausgeführt. Es konnte sichergestellt werden, daß die TVV jeder Blutprobe frühestens 12 Stunden bis spätestens 24 Stunden nach Blutentnahme gemessen wurde.

Die TVV wurde mit dem Thrombozyten-Zählgerät Ultra-Flow 100 computerunterstützt ermittelt.

Prinzip der Messung:

Antikoaguliertes Vollblut wird nach Vorschrift geeignet verdünnt und durch eine Mikrokapillare in den Ultra-Flow gesaugt. In Abhängigkeit vom Volumen des die Kapillare passierenden Partikels wird eine analoge Widerstandsänderung mittels eines angelegten elektrischen Feldes registriert. Dieses Signal wird elektronisch verstärkt und gelangt dann zur Digitalisierung in den Mehrkanalanalysator ND 60. Die jetzt am Ausgang des Analysators erhaltenen Daten werden zur graphischen Darstellung und zur statistischen Bewertung einem Tischrechner (Commodore-Pet-2001) zugeführt. Dieser ermittelt die relative Häufigkeit der gemessenen Thrombozytenvolumina in 20 Größenklassen, vergleicht die Ergebnisse mit der Norm und bewertet diesen Vergleich entweder mit "keine Abweichung vom Normalkollektiv" oder mit "signifikante Abweichung vom Normalkollektiv" in den entsprechenden Größenklassen.

Der Vergleich mit einem anderen Meßsystem zur Bestimmung der TVV ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede bei Normalpersonen.

Vorteile der Messung der TVV mit dem Ultra-Flow 100 sind leichte Handhabung, einfache Wartung, kurze Meßzeiten (60 sek.) und Messung aus der Vollblutprobe (28,30).

VII. Ergebnisse und Diskussion der Heterozygotentestung

1. Patientengruppe

Es konnten 19 Probandinnen nach dem von uns modifizierten Heterozygotentest nach SHAPIRO et al. getestet werden. Von diesen Frauen konnten drei als sicher heterozygot (nach den oben erwähnten Kriterien; siehe S. 18) gelten, die übrigen 16 Frauen waren fraglich heterozygot, d.h. sie waren entweder Schwestern von Müttern von einem oder mehreren Buben mit WAS oder Schwestern von Buben mit WAS.

2. Kontrollgruppe

Zur Erstellung von Normalwerten wurde der Heterozygotentest bei 17 gesunden weiblichen Probanden - zumeist Klinikpersonal - durchgeführt, wobei die Altersverteilung weitgehend der Altersverteilung in der Patientengruppe entsprach.

Die Probanden beider Gruppen wurden gebeten, auf die Einnahme jeglicher Medikamente - insbesondere Schmerzmittel - für die letzten 10 Tage vor der Blutentnahme für den Heterozygotentest zu verzichten. Eine Ausnahme bildeten aus den oben erwähnten Gründen (siehe S. 38) lediglich Kontrazeptiva.

Die Tageszeit der Blutentnahme konnte aus technischen Gründen nicht einheitlich gehalten werden; ebenso war es nicht möglich, eine definierte Nahrungskarenz vor Blutentnahme einzuhalten.

3. Ergebnisse des Heterozygotentests

Das PRP der Kontrollgruppe und der Patientengruppe wurde zu Beginn und am Ende des Versuchs jeweils ohne den Stoffwechselblocker DDG mit $5,0 \mu\text{mol}$ Adrenalin/l aggregiert. War in beiden Fällen die Steigung der 2. Welle größer als 45° (= frei festgelegtes Entscheidungskriterium), so wurde das PRP des Untersuchten als testbar eingestuft.

Als Kriterium für die Energiestoffwechselreserve, die nach SHAPIRO et al. (59) bei WAS-Heterozygoten deutlich unter der Norm liegt, wurde diejenige Konzentration an DDG festgelegt, die gerade ausreicht, um die 2. Welle der Adrenalin-induzierten Aggregation zu unterdrücken, bzw. die ausreicht, um die Steigung der 2. Welle unter 45° zu bringen. Diese Konzentration an DDG wird im Folgenden als "minimale Hemmkonzentration DDG" ($\text{tg } \alpha_2 < 1,0$) bezeichnet.

Zur Verdeutlichung des Versuchsablaufs und der Versuchsauswertung sind in Abb. 9 schematisch die Aggregogramme einer gesunden Probandin (Abb. 9a) und einer genetisch sicheren Heterozygoten (Abb. 9b) dargestellt.

Die Abb. 9a) (gesunde Probandin) zeigt im Aggregogramm den Verlust der 2. Welle bei einer minimalen Hemmkonzentration DDG von $45,0 \text{ mmol/l}$.

In Abb. 9b) (Heterozygote) beträgt die minimale Hemmkonzentration DDG $2,25 \text{ mmol/l}$.



Abb.9:

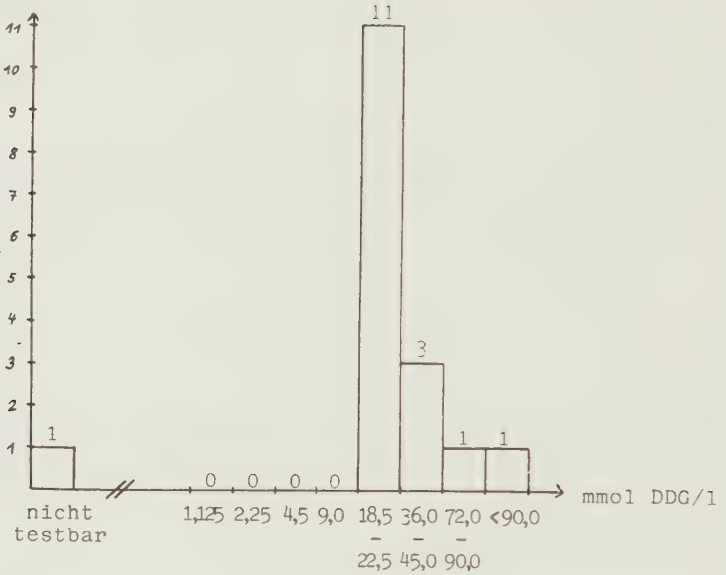
Aggregogramme ohne Stoffwechselblocker und mit unterschiedlichen DDG-Konzentrationen

a) einer gesunden Probandin

b) einer WAS-Heterozygoten

a)

Häufigkeit



b)

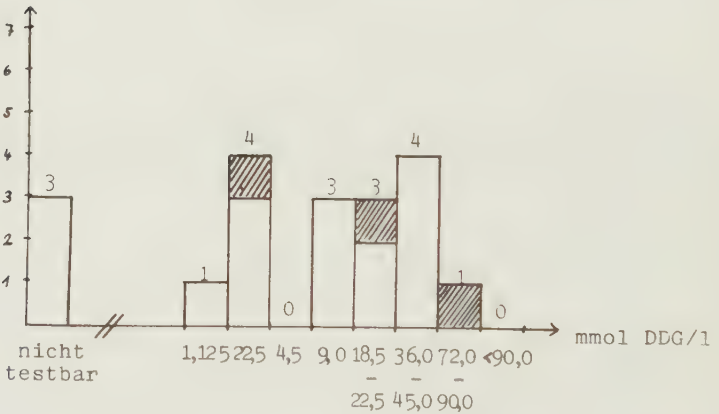


Abb.10:

Minimale Hemmkonzentrationen DDG (Erklärung siehe Text)

a) Gesunde Probandinnen (Kontrollgruppe)

b) Fragliche (weiß) und sichere (schraffiert) WAS-Heterozygoten

In Abb.10 sind die Ergebnisse unserer Studie bei den gesunden Probandinnen (Abb.10a) und bei den fraglichen und sicheren WAS-Heterozygoten (Abb.10b) gegenübergestellt. Es sind die Häufigkeiten über der jeweiligen minimalen Hemmkonzentration aufgetragen. Direkt an der Ordinate liegen die nicht testbaren PRP-Proben. Die nicht testbare Probandin in Abb.10a) litt an einer bis dahin nicht erkannten, funktionell unbedeutenden Thrombopathie, die nachträglich im Labor Prof. MARX, Medizinische Klinik Innenstadt der Universität München, diagnostiziert wurde. Von den drei nicht testbaren fraglichen Heterozygoten in Abb.10b) hatte eine Probandin vier Tage vor dem Test Schmerzmittel (insgesamt 750 mg Azetylsalizylsäure) eingenommen und war deshalb erklärlicherweise nicht testbar; die anderen beiden waren aus nicht feststellbaren Gründen nicht testbar.

4. Ergebnisse der Thrombozyten-Volumen-Verteilung

Abb.11 zeigt die beiden typischen Ergebnisse der Thrombozyten-Volumen-Verteilung (TVV). Die Bewertung der TVV und der Ausdruck der Graphik wurden automatisch durch den Computer erstellt. Dabei wurden bei unseren Berechnungen nur die Aussagen "Keine Abweichung vom Normalkollektiv" und "Signifikante Abweichung vom Normalkollektiv in den Größenklassen $1,1 \mu\text{m}^3$ oder $2,2 \mu\text{m}^3$ " als Kriterium verwendet.

In Abb.11a) ist eine normale TVV mit nur einem Maximum um die Größenklasse $7,0 \mu\text{m}^3$ dargestellt. An 10 Probandinnen aus der Kontrollgruppe konnte die TVV durchgeführt werden. Alle hatten eine der Abb.11a) entsprechende normale TVV.

Die Verteilung in Abb.11b) ist typisch für eine TVV, die wir bei mehreren der untersuchten fraglichen WAS-Heterozygoten erhielten. Sie zeigt in der kleinsten Größenklasse ($2,2 \mu\text{m}^3$) eine deutlich über die Norm erhöhte Häufung und

ist im Falle dieser Probandin sogar zweigipflig. 17 Heterozygote (14 fragliche und 3 sichere) wurden mit der TVV untersucht. Bei 5 von ihnen zeigte sich eine signifikante Abweichung vom Normalkollektiv in den kleinen Größenklassen; 12 hatten keine Abweichung.

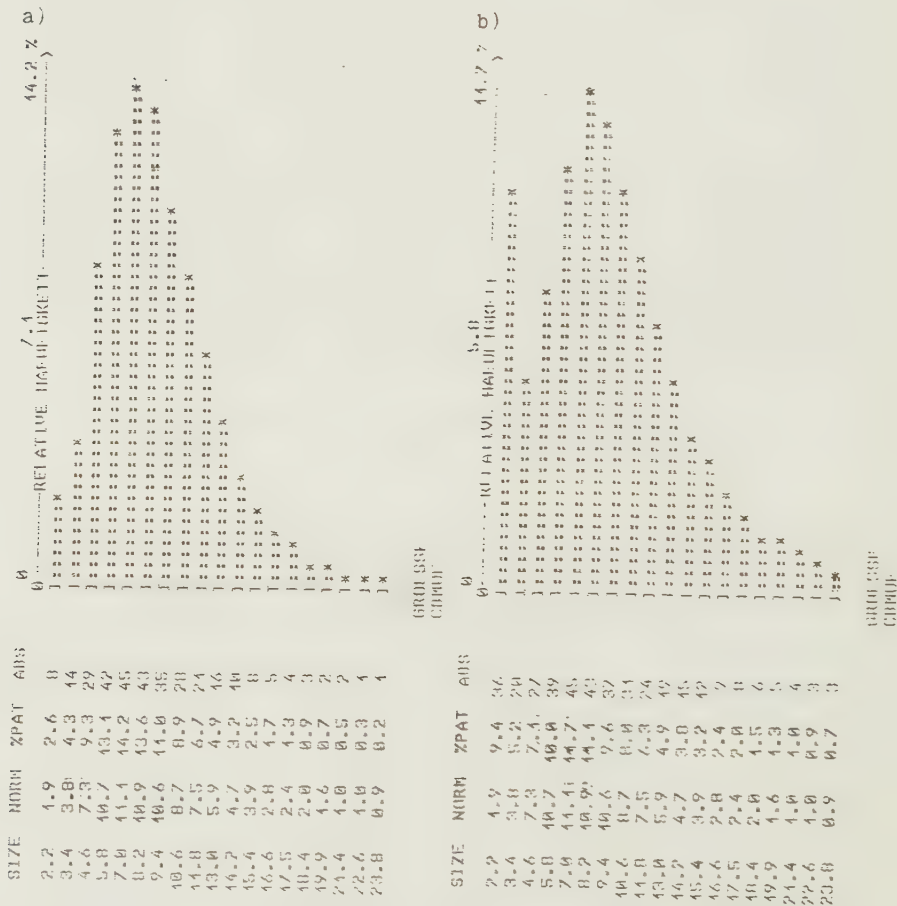


Abb. 11:

Thrombozyten-Volumen-Verteilung (Computerausdruck)

a) normale TVV (keine Abweichung vom Normalkollektiv)

b) pathologische TVV (signifikante Abweichung vom Normalkollektiv in der Größenklasse 2,2)

5. Vergleich: Heterozygotentest - TVV

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Heterozygotentests und der Thrombozyten-Volumen-Verteilung auf Übereinstimmung überprüft. (Beide Untersuchungen wurden bei den jeweiligen Personen aus den gleichen Blutproben gemacht.) Abb.12 zeigt den Vergleich bei den gesunden Probandinnen (Abb.12a)) und bei der Heterozygotengruppe (Abb.12b)).

		Heterozygotentest	
		H	nH
T V V	H	Ø	Ø
	nH	Ø	10

		Heterozygotentest	
		H	nH
T V V	H	3	2**
	nH	2*	10

a) gesunde Kontrollgruppe

b) Heterozygotengruppe

* davon eine sichere
Heterozygote

** beide sicher heterozygot

Abb.12: Vergleich der Ergebnisse von Heterozygotentest und Thrombozyten-Volumen-Verteilung (Erklärung siehe Text)

Zur graphischen Verdeutlichung wurde eine Vier-Felder-Darstellung gewählt, bei der die Ergebnisse des Heterozygotentests durch Addition der vertikalen Spalten, die Ergebnisse der TVV durch Addition der horizontalen Spalten ermittelt werden können. Die Übereinstimmung, gemessen als Heterozygotie im Heterozygotentest und als Abweichung vom Normalkollektiv in der TVV, kann im oberen linken Feld unter dem Buchstaben H (= Heterozygot) abgelesen werden.

Die Übereinstimmung für normales Verhalten in beiden Tests ist im unteren rechten Feld unter nH (= nicht Heterozygot) abzulesen. Das untere linke und das obere rechte Feld zeigen jeweils die Anzahl der Untersuchten, bei denen sich die Aussagen beider Tests widersprechen.

Die Ergebnisse in Abb.12a) können aufgrund der eindeutig übereinstimmenden Testaussagen nicht auf Irrtumswahrscheinlichkeit mit dem exakten Test nach FISCHER (17) überprüft werden. Aus den Ergebnissen in Abb.12b) konnte mit dem exakten Test nach FISCHER für die Übereinstimmung beider Testverfahren eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,1067$ errechnet werden. Mit anderen Worten bedeutet dies eine knapp 90 %ige Sicherheit, daß beide Tests dasselbe messen. Der sehr hohe p-Wert kann in diesem Zusammenhang allerdings nur als Hinweis auf einen möglichen Trend interpretiert werden.

6. Diskussion

- Heterozygotentest nach SHAPIRO et al.:

Das Hauptproblem für die Auswertung der hier vorgestellten Testergebnisse stellt die geringe Anzahl an sicheren WAS-Heterozygoten dar, mithin die Seltenheit des WISKOTT-ALDRICH-Syndroms. Zur Verdeutlichung dieser Schwierigkeit: Von den untersuchten 19 Patienten kamen 14 aus der gesamten BRD, die verbleibenden 5 aus der Schweiz. Da die Untersuchung nur an frisch gewonnenen Thrombozyten durchgeführt werden kann, mußten alle Patienten zur Blutentnahme nach München reisen und gegebenenfalls auch in München übernachten.

Zur Validierung des Tests wäre eine große Anzahl an sicheren Heterozygoten notwendig gewesen; wir konnten jedoch nur

3 untersuchen. Von diesen 3 sicheren Heterozygoten reagierten aber 2 wie die gesunden Probandinnen der Kontrollgruppe; d.h. diese 2 sind nach SHAPIRO et al. (59) als nicht heterozygot für WAS einzustufen. Die dritte sichere Heterozygote reagierte als heterozygot im Sinne SHAPIROS et al.

Man müßte erwarten, daß 100 % der sicheren WAS-Überträgerinnen auch in dem Test als sicher heterozygot erfaßt werden. Aufgrund unserer Ergebnisse allein kann nicht gesagt werden, was gemessen wurde. Wir können nur in Analogie zu den von SHAPIRO et al. beschriebenen Phänomenen annehmen, daß pathologische Aggregogramme eine Heterozygotie für WAS bedeuten, normale Aggregogramme eine Heterozygotie aber nicht ausschließen. Diese Interpretation wird dadurch unterstützt, daß bei uns wie bei SHAPIRO et al. in der Kontrollgruppe keine falsch positiven Ergebnisse beobachtet wurden. Unsere falsch negative Rate in der Patientengruppe von 66 % ist aufgrund der sehr geringen Anzahl an sicheren Heterozygoten ($n = 3$) nur äußerst vorsichtig zu interpretieren. GERRARD et al. (25), die den Test von SHAPIRO et al. an 22 sicheren Heterozygoten durchführten, berichten von 18 % falsch positiven Ergebnissen bei gesunden Kontrollen und 30 % falsch negativen bei Heterozygoten. In dieser Arbeit vertreten GERRARD et al. auch die Meinung, daß dieser Test nicht bei allen vom WAS betroffenen Familien anwendbar und daher zur Heterozygotensuche allein nicht ausreichend sei. Mit GEALYS et al. (23) Theorie (Seite 9 f bereits ausführlich erläutert), daß sichere Heterozygote in früher Embryonalzeit ihr defektes x-Chromosom schon inaktiviert haben, wäre das Phänomen der im Test von SHAPIRO et al. normal reagierenden sicheren Überträgerinnen erklärbar.

- Thrombozyten-Volumen-Verteilung als Heterozygotentest:

Die uns bislang bekannten, in der Literatur beschriebenen TVVen bei WAS-Heterozygoten liegen ausnahmslos im mittleren oder unteren Normbereich (43,48,52). Dennoch wurde bei fast allen unseren Probanden routinemäßig 2 ml 5 %iges

EDTA-Blut zur Bestimmung der TVV nach Homburg/Saar verschickt. Anfangs untersuchte Blutproben mit 2 %igem EDTA oder antikoaguliert mit 3,8 %igem Natriumcitrat 1 : 10 ergaben immer eine pathologische TVV, die offenbar artefaktbedingt war. Mit 5 %igem EDTA-Blut 1 : 10 wurde bei allen gesunden Probandinnen eine normale TVV gemessen. Bei der Gruppe der fraglichen und sicheren Heterozygoten hatten 12 eine normale und 5 eine pathologische TVV (über die Norm erhöhte Mikrothrombozytenpopulation). Von den 5 Patientinnen mit pathologischer TVV waren 2 sicher heterozygot.

Dieses Phänomen, das von uns wegen der Transportprobleme nach dem mehrere 100 Kilometer entfernten Labor in Homburg/Saar nicht weiter untersucht werden konnte, ist möglicherweise auf den unspezifischen Stress des mehrere Stunden dauernden Bahntransport zurückzuführen. Jedenfalls wäre es immerhin möglich, daß ein defekter Energiemetabolismus WAS-heterozygoter Plättchen (6,36,59) durch diesen ziemlich konstanten Transportstress zu einer pathologischen TVV hätte führen können. Eine falsch positive Rate in der Kontrollgruppe von 0 % und eine falsch negative Rate in der Patientengruppe von 33 % würden eine weitere Untersuchung dieses Phänomens durchaus rechtfertigen.

- Vergleich der Ergebnisse des Heterozygotentests und der TVV:

Der auf Seite 49f zum Teil statistisch auf Übereinstimmung überprüfte Vergleich der Ergebnisse beider Tests sagt mit einer 10 %igen Irrtumswahrscheinlichkeit aus, daß das Gleiche (wahrscheinlich WAS-Heterozygotie) gemessen wurde. Besonders bemerkenswert ist, daß die beiden vom Heterozygotentest nicht erfaßten sicheren Heterozygoten von der TVV erkannt wurden bzw. daß die vom Heterozygotentest erfaßte sichere Heterozygote von der TVV nicht erkannt wurde. Nimmt man die Aussagen beider Tests zusammen, so wurden alle sicheren Überträgerinnen erkannt, was eine falsch negative Rate von 0 % ergäbe . Auch alle Probanden der Kontrollgruppe

wurden in beiden Tests übereinstimmend als gesund erkannt, was einer falsch positiven Rate von ebenfalls 0 % entspräche. Diese Gedanken sind natürlich aufgrund der sehr geringen Anzahl der Getesteten statistisch nicht hinreichend sicher überprüfbar und somit wohl eher spekulativ.

Es wäre sehr interessant und aufschlußreich, diese beiden Tests gemeinsam an einer größeren Gruppe sicherer WAS-Heterozygoten durchzuführen. Wegen der Seltenheit der WAS und dem damit verbundenen hohen organisatorischen und finanziellen Aufwand scheint uns dies aber in der BRD nur schwer möglich zu sein.

VIII. Zusammenfassung

Das WISKOTT-ALDRICH-Syndrom ist eine x-chromosomal rezessiv vererbte Erkrankung, bei der die betroffenen Buben trotz aller Therapie meist in früher Kindheit, jedoch spätestens in der Adoleszenz versterben.

Eine Möglichkeit, das Auftreten der Erkrankungsfälle in den betroffenen Familien zu reduzieren, besteht in der Durchführung von Heterozygoten-Suchtests bei allen weiblichen Mitgliedern der betroffenen Familien (inklusive der Schwestern der fraglich oder sicher heterozygoten Mutter). Eine anschließende genetische Beratung mit in der Folge konsequenter Geburtenkontrolle würde zwar nicht die Verbreitung des WAS-Genes verhindern, würde jedoch dazu beitragen, das weitere Auftreten von WAS-Fällen in dieser Familie zu unterbinden.

Der Test von SHAPIRO et al. nützt einen klinisch kompensierten Stoffwechseldefekt der Thrombozyten WAS-heterozygoter Frauen aus, um mittels Thrombozyten-Funktionstests unter definierten Stressbedingungen diesen Defekt zu demaskieren. SHAPIRO et al. berichten von ermutigenden Ergebnissen, stellen aber klar, daß dieser Test allein unzureichend ist zur Erkennung aller WAS-Überträgerinnen.

Da auch in der BRD mehrere Familien mit WAS-Erkrankungsfällen bekannt sind, konnte dieser Test hier durchgeführt werden. Wegen der Seltenheit der Erkrankung und der teilweise langen Anreisewege konnten nur 19 der in Frage kommenden Frauen untersucht werden.

Die als Thrombozyten-Funktionstest angewandte Adrenalin-induzierte Aggregation ist durch ihre Unzuverlässigkeit besonders problematisch. Durch eigene Voruntersuchungen zur Erhöhung der Zuverlässigkeit mit anschließender Modifi-

kation des Tests wurde diese Schwierigkeit weitgehend beseitigt.

Parallel zum Test nach SHAPIRO et al. erfolgte bei den meisten der Untersuchten auch die Bestimmung der Thrombozyten-Volumen-Verteilung in einem auswärtigen Labor. Interessanterweise zeigten beide Tests eine gewisse Übereinstimmung, was die fraglichen Heterozygoten betrifft, eine vollständige Übereinstimmung in der Kontrollgruppe (gesunde Probandinnen) und keine Übereinstimmung bei den sicheren Heterozygoten.

Mit der TVV konnten zwei sichere Heterozygote, mit dem Test nach SHAPIRO et al. konnte die dritte und letzte sichere Heterozygote erkannt werden. Möglicherweise bietet sich die TVV in Zukunft als weiterer Heterozygoten-Suchtest bzw. als Ergänzung des Tests nach SHAPIRO et al. an. Ob die Ergebnisse der TVV nur zufällig gemessen sind und was die TVV überhaupt mißt, muß noch an einer wesentlich größeren Population von sicheren WAS-Heterozygoten erforscht werden.

IX. Literaturverzeichnis

1. ALDRICH, R.A., A.G. STEINBERG and D.C. CAMPBELL:
Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition
characterized by draining ears, eczematoid dermatitis
and bloody diarrhea. J. of Pediatrics, 13, 133 (1954)
2. ARDLIE, N.G., G. GLEW and C.J. SCHWARTZ: Influence of
catecholamines on nucleotide-induced platelet aggrega-
tion. Nature, 212, 415 (1966)
3. AUGUST, C.S., W.E. HATHAWAY, J.H. GITHENS, K. MCINTOSH
and B. FAVARA: Improved platelet function following
bone-marrow transplantation in an infant with the
Wiskott-Aldrich syndrome. J. of Pediatrics, 82, 58
(1973)
4. BACH, F.H., R.J. ALBERTINI, R. JOO, J.L. ANDERSON and
M.M. BORTIN: Bone-marrow transplantation in a patient
with the Wiskott-Aldrich syndrome. Lancet, II, 1364 (1968)
5. BALDINI, M.G.: Nature of the platelet defect in the
Wiskott-Aldrich syndrome. Annals New York Academy of
Science. 201, 437 (1972)
6. BALLOW, M., B. DUPONT and R.A. GOOD: Autoimmune hemo-
lytic anemia in Wiskott-Aldrich syndrome during treat-
ment with transfer factor. J. of Pediatrics, 83, 772
(1973)
7. BELOHRADSKY, B.H., C. GRISCELLI, H.H. FUDENBERG und
W. MARGET: Das Wiskott-Aldrich Syndrom. Ergeb. inn. Med.
und Kinderheilkunde (Springer-Verlag), 41, 85 (1978)
8. BENSEL, R.W. ten, E.M. STADLAN and W. KRIVIT: The
development of malignancy in the course of the Aldrich-
syndrome. J. of Pediatrics, 68, 761 (1966)

9. BLAESE, R.M., W. STROBER, R.S. BROWN and T.A. WALDMANN:
The Wiskott-Aldrich syndrome. A disorder with a possible
defect in antigen processing or recognition. Lancet, I,
1056 (1968)
10. BREDDIN, K., H. GRUN, H.J. KRZYWANEK und W.P. SCHREMMER:
Zur Messung der "spontanen" Thrombozytenaggregation,
Plättchenaggregationstest III. Methodik. Klin. Wschr.,
53, 81 (1975)
11. BREDDIN, K., M. ZIEMEN, O. BAUER, W. HERRMANN, L. SCHAU-
DINN, U. SCHLOSSER, A. WINTERHAGER and H.J. KRZYWANEK:
Time and temperature dependent changes of ADP-, collagen-
or epinephrine-induced and "spontaneous" platelet aggre-
gation in relation to morphologic platelet changes.
Thrombosis Research, 19, 621 (1980)
12. BREDDIN, K.: Adrenalin-induzierte Plättchen-Aggregation:
Methode und Störfaktoren. Persönliche Mitteilung 1979
(Frankfurt)
13. BROCKHAUS, W.: Adrenalinkonzentration, Zentrifugation,
Variabilität. Telefonische Auskunft vom 06. 02. 1980
(Nürnberg)
14. BRUCE, R. and R.M. BLAESE: Monoclonal gammopathy in the
Wiskott-Aldrich syndrome. J. of Pediatrics, 85, 204
(1974)
15. CANALES, M.L. and A.M. MAURER: Sex-linked hereditary
thrombocytopenia as a variant of Wiskott-Aldrich syn-
drome. New Engl. J. of Med., 277, 899 (1967)

16. CARROLL, A., J.T. PRCHAL and W.M. CRIST: Cellular expression of the Wiskott-Aldrich allele. *Lancet*, I, 601 (1980)
17. CLAUSS, G. und H. EBNER: Grundlagen der Statistik. Verlag Harri Deutsch, Zürich und Frankfurt/Main (1975)
18. COOPER, M.D., H.P. CHASE, J.T. LOWMAN, W. KRIVIT and R.A. GOOD: Wiskott-Aldrich syndrome. An immunologic deficiency disease involving the afferent limb of immunity. *Am. J. of Med.*, 44, 499 (1968)
19. CORASH, L., B. SHAFER and R.M. BLAESE: Platelet associated immunoglobulin platelet size and the effect of spleenectomy in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 65, 1439 (1985)
20. DETWILER, T.C.: Effects of deoxyglucose on platelet metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 244, 303 (1971)
21. ELKELES, R.S., J.R. HAMPTON and J.R.A. MITCHELL: Effect of oestrogens on human behaviour. *Lancet*, 315 (1968)
22. FILIPOVICH, A.H., W. KRIVIT, J.H. KERSEY and B.A. BURKE: Fatal arteriitis as a complication of Wiskott-Aldrich syndrome. *J. of Pediatrics*, 95, 742 (1979)
23. GEALY, W.J., J.M. DWYER and J.B. HARLEY: Allelic exclusion of glucose-6-phosphat-dehydrogenase in platelets and in t- lymphocytes from a Wiskott-Aldrich syndrome carrier. *Lancet*, I, 63 (1980)
24. GEME, J.W.S., J.T. PRINCE, B.A. BURKE, R.A. GOOD and W. KRIVIT: Impaired cellular resistance to herpes-simplex virus in Wiskott-Aldrich syndrome. *New Engl. J. of Med.*, 273, 229 (1965)

25. GERRARD, J.M., G.S. PERRY III, R.S. SHAPIRO, B. SPECTOR, R.M. BLAESE, W. KRIVIT, J.H. KERSEY and J.G. WHITE: Further studies of a metabolic stress test in Wiskott-Aldrich syndrome carriers. Am. J. Pediatric Hematology/Oncology, 2, 25 (1980)
26. GRÖTTUM , K.A., T. HOVIG, H. HOLMSEN, A.F. ABRAHAMSEN, M. JEREMIC and M. SEIP: Wiskott-Aldrich syndrome: qualitative platelet defects and short platelet survival. British J. of Hematology, 17, 373 (1969)
27. HARRISON, M.J.G., P.R. EMMONS and J.R.A. MITCHELL: The variability of human platelet aggregation. J. of Atherosclerosis Research, 7, 197 (1967)
28. HELLSTERN, P.: Thrombozyten-Volumen-Verteilung. Persönliche Mitteilung (1981)
29. HOLMSEN, H., C.A. SETKOWSKY and H.J. DAY: Effects of antimycin and 2-deoxy-glucose on adenin nucleotides in human platelets. Role of metabolic adenosine triphosphate in primary aggregation, secondary aggregation and shape change of platelets. Biochem. J., 144, 385 (1974)
30. JÄGER, H., P. HELLSTERN und E. WENZEL: Thrombozytenzählung und Thrombozytenvolumenverteilung im Vollblut. Labor Medizin, 2, 132 (1980)
31. JOHNSON, M., E. RAMEY and P.W. RAMWELL: Sex and age differences in human platelet aggregation. Nature, 253, 355 (1975)
32. KAPOOR, N., D. KIRKPATRICK, R.M. BLAESE, J. OLESKE, M.H. HILGARTNER, R.S.K. CHAGANTI, R.A. GOOD and R.J. O'REILLY: Reconstitution of normal megakaryocytopoiesis and immunologic functions in Wiskott-Aldrich syndrome by bone-marrow transplantation. Blood, 57, 692 (1981)

33. KLOSE, H., H. RIEGER and H. SCHMID-SCHÖNBEIN: A rheological method for the quantification of platelet aggregation (PA) in vitro and its kinetics under defined flow conditions. *Thrombosis Research*, 7, 261 (1975)
34. KRIVIT, W. and R.A. GOOD: Aldrich's syndrome (thrombocytopenia, eczema, and infections in infants). *Studies of the defense mechanisms. A.M.A. J. of Diseases of Children*, 97, 137 (1959)
35. KRIVIT, W., E. YUNIS and J.G. WHITE: Platelet survival studies in Aldrich syndrome. *J. of Pediatrics*, 37, 339 (1966)
36. KURAMOTO, A., M. STEINER and M.G. BALDINI: Lack of platelet response to stimulation in the Wiskott-Aldrich syndrome. *New Engl. J. of Med.*, 282, 475 (1970)
37. LUM, L., H.D. OCHS, F.L. JOHNSON and R.F. STORB: Wiskott-Aldrich syndrome: Immune status after bone marrow transplantation. *Pediatric Research*, 15, 581 (1981)
38. LUM, L., D.G. TUBERGEN, L. CORASH and R.M. BLAESE: Splenectomy in the management of the thrombocytopenia of the WAS. *New Engl. J. of Med.*, 892 (1980)
39. MACMILLAN, D.C.: Secondary clumping effect in human citrated platelet-rich plasma produced by adenosine diphosphate and adrenaline. *Nature*, 211, 140 (1966)
40. MONTANARI, C.M.D., A. VITTORIA, U. ROSSI and P. SALA: Human platelet aggregation curve and oral contraception. *Acta haemat.*, 61, 230 (1979)
41. MÜRER, E.H., A.J. HELLEM and M.C. ROZENBERG: Energy metabolism and platelet function. *Scan. J. of Invest.*, 19, 280 (1967)

42. MURKEN, J.-D.: Persönliche Mitteilung. München (1981)
43. MURPHY, S., F.A. OSKI, J.L. NAIMAN, C.J. LUSCH, S. GOLDBERG and F.H. GARDNER: Platelet size and kinetics in hereditary and acquired thrombocytopenia. New Engl. J. of Med., 286, 499 (1972)
44. NATHAN, D.: Splenectomy in the Wiskott-Aldrich syndrome. New Engl. J. of Med., 302, 916 (1980)
45. NEDELLEC, J.: TRIS-Puffer pH, variability, Lagerung des PRP. Telephonische Auskunft vom 6. 2. 80 (Paris)
46. NEDELLEC, J.: Konzentrationen von Adrenalin, Unsicherheit der Aggregation mit Adrenalin. Brief vom 6. 3. 80 (Paris)
47. O'BRIEN, J.R.: Variability in the aggregation of human platelets by adrenaline. Nature, 202, 1188 (1964)
48. OCHS, H.D., S.J. SLICHTER, L.A. HARKER, W.E. von BEHRENS, R.A. CLARK and R.J. WEDGWOOD: The Wiskott-Aldrich syndrome: Studies of lymphocytes, granulocytes, and platelets. Blood, 55, 243 (1980)
49. PARKMAN, R., J. RAPPEPORT, R. GEHA, J. BELLI, R. CASSEDY, R. LEVEY, D.G. NATHAN and F.S. ROSEN: Complete correction of the Wiskott-Aldrich syndrome by allogenic bone-marrow transplantation. New Engl. J. of Med., 298, 921 (1978)
50. PARKMAN, R. and S. PERRINE: The Wiskott-Aldrich syndrome: A membrane defect of the lympho-hematopoietic system. Pediatric Research, 15, 602 (1981)
51. PERRY III, G.S., B.D. SPECTOR, L.M. SCHUMAN, J.S. MANDEL, V.E. ANDERSON, R.B. MCHUGH, M.R. HANSON, S.M. FAHLSTROM, W. KRIVIT and J.H. KERSEY: The Wiskott-Aldrich syndrome in the United States and Canada (1892 - 1979). J. of Pediatrics, 97, 72 (1980)

52. PRCHAL, J.T., A.J. CAROLL, J.F. PRCHAL, W.M. CRIST, H.W. SKALKA, W.J. GEALY, J. HARLEY and A. MALLUH: Wiskott-Aldrich syndrome: Cellular impairments and their implication for carrier detection. Blood, 56, 1048 (1980)
53. PUMPHREY, A.M.: Studies on the electron transfer system. Some effects of antimycin on cytochrome B. J. biol. Chemistry, 237, 2384 (1962)
54. RIEGER, H., H. SCHMID-SCHÖNBEIN und L. WURZINGER : Die spontane Plättchenaggregation beim Menschen unter Wirkung von Sexualhormonen. Dt. med. Wschr., 102, 1248 (1977)
55. ROGERS, A.B.: The effect of pH on human platelet aggregation induced by epinephrine and ADP. Proceedings Soc. for exp. and biol. Med., 139, 1100 (1972)
56. ROTH, G.J. and P.W. MAJERUS: The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. J. clin. Invest., 56, 624 (1975)
57. ROZENBERG, M.C. and H. HOLMSEN: Adenine nucleotide metabolism of blood platelets. Uptake of adenosine and inhibition of ADP-induced platelet aggregation. Biochimica and biophysica acta, 155, 342 (1968)
58. SCHWARTZ, C.J. and N.G. ARDLIE: Catecholamines and platelet aggregation. Circulation Research, 10 + 11, supp. III (1967)
59. SHAPIRO, R.S., G.S. PERRY III, W. KRIVIT, J.M. GERRARD, J.G. WHITE and J.H. KERSEY: Wiskott-Aldrich syndrome: Detection of carrier state by metabolic stress of platelets. Lancet, I, 121 (1978)
60. SPECTOR, B.: persönliche Mitteilung, Brief vom 25.1.1980

61. SPITLER, L.E.: Transfer factor therapy in the Wiskott-Aldrich syndrome. Results of long-term follow-up in 32 patients. Am. J. Med., 67, 59 (1979)
62. STORMORKEN, H.: The normal blood platelet and its function. Rikshospitalet, Oslo, Norway (Vortrag 1976)
63. SUTOR, A.H.: Medikamentöse Störungen der Hämostase. Monatsschr. f. Kinderheilkunde, 127, 146 (1979)
64. THOMAS, L.: Labor und Diagnose. Die med. Verlagsgesellschaft, Marburg/L., 565 (1978)
65. ULUTIN, O.N.: The platelets. Fundamentals and clinical applications. Printed in Istanbul, Turkey by Kâğıt ve Basım İşleri A.S., 151 (1976)
66. WARLOW, Ch., A. CORINA, D. OGSTON and A.S. DOUGLAS: The relationship between platelet aggregation and time interval after venepuncture. Thrombos. Diath. haemorrh., 31, 133 (1974)
67. WEBB, J.L.: Effects of 2-deoxy-D-glucose on carbohydrate metabolism. Enzyme and metabolic inhibitors, 2, 368 (1966)
68. WEIDEN, P.L. and R.M. BLAESE: Hereditary thrombocytopenia: Relation to Wiskott-Aldrich syndrome with special reference to splenectomy. J. of Pediatrics, 80, 226 (1972)
69. WEISS, H.J.: Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts). New Engl. J. Med., 531 (1975)

70. WEISS, H.J.: Platelet physiology and abnormalities of platelet function (second of two parts). New Engl. J. Med., 583 (1975)
71. WEISS, H.J.: Antiplatelet therapy (first of two parts). New Engl. J. Med., 298, 1344 (1978)
72. WISKOTT, A.: Familiärer angeborener Morbus Werlhofii? Monatsschr. Kinderheilk., 68, 212 (1937)
73. WOLFF, J.A.: Wiskott-Aldrich syndrome: Clinical, immunologic, and pathologic observations. J. of Pediatrics, 70, 221 (1967)

Herrn Prof. Dr. K. Betke danke ich für die Arbeitsmöglichkeit in seiner Klinik.

Herrn Priv. Doz. Dr. H.J. Klose danke ich für die fachliche und menschliche Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche.

Herrn Priv. Doz. Dr. P. Hellstern möchte ich meinen Dank für die Organisation und Durchführung der Thrombozyten-Volumen-Verteilungs-Messung aussprechen.

Herrn Priv. Doz. Dr. B.H. Belohradsky danke ich für die Schaffung persönlicher Kontakte mit ausländischen Laboratorien und für die Bereitstellung der Adressen der Probandinnen.

Meiner Ehefrau Ingeborg danke ich herzlich für die Niederschrift dieser Arbeit.

Lebenslauf

Am 10.12.1952 wurde ich als erstes Kind des Diplomkaufmanns Hermann Prändl und seiner Ehefrau Dr. med. Anita Prändl, geb. Ramp, in Neuburg/Donau geboren.

Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule und anschließend bis zur Reifeprüfung 1972 das Descartes-Gymnasium in Neuburg/Donau.

Als Sanitätssoldat diente ich von 1972 bis 1974 in Starnberg. Bis zur Zulassung zum Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München im Herbst 1974 arbeitete ich ca. ein halbes Jahr als Pflegehelfer an der Universitätsklinik Ulm.

Nach zwei Semestern bestand ich das Vorphysikum in der Tiermedizin; nach dem dritten Semester exmatrikulierte ich mich, um auf einen Studienplatz in der Humanmedizin zu warten.

Die Wartezeit von 1976 bis 1977 verbrachte ich wiederum als Pflegehelfer in der chirurgischen Universitätsklinik Nußbaumstraße in München.

Zum Sommersemester 1977 konnte ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilian-Universität München aufnehmen. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich 1978, den ersten Teil der ärztlichen Prüfung 1979 und den zweiten Teil 1981. Die Innere Medizin im praktischen Jahr verbrachte ich in der medizinischen Klinik Ziemssenstraße in München (Schwerpunkt Endokrinologie), die Chirurgie im städtischen Krankenhaus Ingolstadt (vorwiegend Bauchchirurgie und chirurgische Ambulanz) und das Wahlfach Pädiatrie im Haunerschen Kinderspital in München (Neugeborenen-Intensiv-Station und pädiatrische Ambulanz). Am 28.4.1982 bestand ich die ärztliche Prüfung; meine Approbation als Arzt erhielt ich am 3.5.1982.

Am 1.10.1982 nahm ich als Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung der Kliniken St. Elisabeth in Neuburg/Donau meine berufliche Tätigkeit auf. Seit 1.10.1983 arbeite ich in der gleichen Klinik als Assistent in der internen Abteilung. Mein Ausbildungsziel ist Arzt für Allgemeinmedizin.

